

**Untersuchungen über chemische
und physikalische Beeinflussungen
von Konservenblut**

Eike Hagen Kipka

Dr. Paulus Hagen
1963

Aus dem Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt am Main

(Direktor : Prof. Dr. E. Heinz)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE
BEEINFLUSSUNGEN VON KONSERVENBLUT.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe -Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Eike Hagen Kipka
aus Trier

Frankfurt/M. 1962

Dekan : Prof. Dr. W. Krücke

Referent : Prof. Dr. L. Róka

Korreferent : Prof. Dr. F. Hoff

Mündliche Prüfung : 7. März 1963



Einleitung

Eine der logischen Konsequenzen nach Harvey's Entdeckung des Blutkreislaufs war die Überlegung, das Gefäßsystem eines blutarmen Patienten mit fremdem Blut aufzufüllen. So transfundierte 1665 Richard Lower tierisches Blut auf ein anderes Tier und 1667 behandelte Jean Denis einen anämischen Jungen erfolgreich mit Tierblut. Die für uns heute verständlichen Zwischenfälle in der Folgezeit führten zu einem Verbot solcher therapeutischer Maßnahmen. Erst 1818 nahm James Bundell diese Versuche wieder auf. Klinische Bedeutung erlangte die Bluttransfusion durch Landsteiner, Decastello und Sturli, die um 1900 die Gruppen des ABO-Systems entdeckten. Einen weiteren Fortschritt bedeutete die Möglichkeit, Blut durch Zusatz von Natriumcitrat ungerinnbar zu machen. Damit war die Möglichkeit der Blutkonservierung gegeben.

Dadurch, daß es gelang, Blut auch außerhalb des Körpers in flüssigem, ungeronnenem Zustand zu erhalten, war allerdings noch nicht gesagt, daß dabei alle seine Bestandteile intakt bleiben. Wie lange das Blut als Konserve verwendbar ist, hängt von den Veränderungen ab, die während der Lagerungszeit eintreten.

In erster Linie kommt es auf die Erythrocyten an, die übertragen werden sollen; dann auf die den kolloid-osmotischen Druck repräsentierenden Proteine, insbesondere das Albumin; schließlich aber auch auf die übrigen Proteine mit ihren spezifischen Funktionen, wie Globuline (Antikörper), Gerinnungsfaktoren etc. Auch dürfen keine toxisch wirkende Zerfallsprodukte auftreten.

Da das Gerinnungssystem sehr labil ist und schon in vivo einen turnover zeigt, war es interessant zu prüfen, wie es sich in der Konserve verhält.

Zum besseren Verständnis sei nochmals kurz auf den Gerinnungsablauf hingewiesen :

Tritt Blut aus seinen natürlichen Bahnen, dem Gefäßsystem, aus, so wird sein Gerinnungsgleichgewicht gestört. Der Hageman-Faktor (Faktor XII), der im strömenden Blut in inaktiver Form vorhanden ist, wird durch Berührung mit gefäßfremdem Material in ein aktives Ferment überführt. Nachdem er das Thromboplastin Antecedent (Faktor XI), das ebenfalls im strömenden Blut vorhanden ist, unter dem Einfluß von Ca^{++} -Ionen in Faktor IX um- bzw. abgebaut hat, wird er selbst in inaktive Endstufen umgewandelt. Auf welche Art dies geschieht, ist noch nicht klar.

Der Christmas -Faktor (Faktor IX) bildet nun mit dem Antihämophilen Globulin A (Faktor VIII), dem Stuart-Prower-Faktor (Faktor X) und dem Proaccelerin (Faktor V) unter Ca^{++} -Ioneneinfluß das Thrombokinasferment.

Über diese Stufe des Gerinnungsvorganges bestehen noch keine genauen Vorstellungen. Man könnte sich vorstellen, daß aus Faktor VIII und Faktor IX durch Faktor X - Einwirkung ein Zwischenprodukt 1 entsteht, das seinerseits mit Faktor V zu Thrombokinasferment reagiert. Wir vermuten, daß der Faktor VIII die Bildung des Zwischenproduktes aus Faktor X und Faktor IX bewirkt und selbst in inaktive Endstufen überführt wird (und zwar durch Fermente des fibrinolytischen Systems). Das Thrombokinasferment bildet sich nun beim Zusammenwirken von Faktor V und dem Zwischenprodukt. Danach wird Faktor V ebenfalls durch Plasmin inaktiviert.

Wie RÖKA zeigen konnte, wirkt das Thrombokinasferment ähnlich Trypsin auf das Prothrombin (Faktor II) ein, so daß daraus ein Derivat - noch ohne Thrombinwirkung - entsteht. Das Zwischenprodukt wird jetzt unter dem Einfluß von Lipid, das bei der viskösen Methamorphose von Thrombozyten unter Thrombin-Einfluß freigesetzt wurde, in Thrombin überführt. Dies bewirkt seinerseits die Abspaltung zweier Teile des Fibrinogens, wodurch der Polymerisationsvorgang der Fibrin-Netzbildung in Gang gebracht wird. Das Thrombin selbst wird unter der Wirkung von Antithrombin gehemmt und schließlich in unwirksames Metathrombin überführt.

Auch das Fibrinnetz, ja schon Fibrinogen selbst, wird von den fibrinolytischen Gegenspielern abgebaut und inaktiviert, wobei u. a. ein Antithrombin entsteht.

Das fibrinolytische System baut neben Fibrinogen und Fibrin auch andere Gerinnungsfaktoren ab und inaktiviert sie. Das haben JUNG und DUCKERT für die Faktoren V, VIII und Thrombin gezeigt. Ob dies auch für die übrigen Faktoren, die beim Gerinnungsvorgang nicht verbraucht werden, wie Faktor VII, Lipid und Thrombokinasferment gilt, ist nicht erwiesen, würde aber sehr gut zu diesen Vorstellungen des Gerinnungsvorganges und eines fließenden hämostyptisch-fibrinolytischen Gleichgewichtes passen. Eine andere, sich dieser Ansicht einfügende Möglichkeit der Elimination dieser nicht verbrauchten Substanzen wäre, daß sich diese mit Teilen ihrer Substrate verbinden oder beladen und damit unwirksam werden. Vielleicht geschieht sogar zunächst dieses und dann jenes.

- 1.) XII $\xrightarrow{\text{Kontakt}}$ aktiver VII $\xrightarrow{\text{Inhibitor}}$ inakt. XII
- 2.) XI + akt. XII + Ca^{++} $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ IX
- 3.) VIII + IX + X $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ Zwischenprodukt 1
- 4.) Zwischenprod. 1 + V $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ TK-Enzym $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$
- 5.) PTB + TK-Enzym $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ Zwischenprodukt
- 6.) Zwischenprod. + TK-Lipid + Ca^{++} $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ TB $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$
- 7a) Thromboz. + TB $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ visköse Metamorphose
- 7b) F' gen + TB $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ F_{mono.}
- 8.) n F_{mono.} $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ F_{poly.} $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ Fibrin
- 9.) Fibrin $\xrightarrow{\text{Fibrinolyt. Syst.}}$ Abbauprodukte

Die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichtes ist die stetige Neubildung der im Blut vorhandenen Gerinnungs- und lytischen Faktoren. Das ist in vivo durchaus der Fall. Wissen wir doch, daß z. B. in der Leber viele Gerinnungsfaktoren gebildet werden.

Unter den Bedingungen der Blutkonservierung ist auch der oben genannte Gerinnungsprozeß mit Entzug der Calciumionen verhindert, jedoch bleiben offenbar auch unter diesen stabilen Bedingungen nicht alle Gerinnungsfaktoren unverändert.

So lassen sich zwei Arten von Veränderungen erwarten :

- 1.) eine unspezifische Denaturierung infolge der Labilität der Proteinmoleküle gegenüber den thermischen Stößen;
- 2.) ein spezifischer fermentativer Abbau durch Fermente, die durch den Entzug der Calciumionen oder durch übrige Konservierungsbedingungen in ihrer Wirkung nicht ausgeschaltet oder direkt aktiviert worden sind.

An den durch ihre biologische Aktivität sehr empfindlichen und spezifisch nachweisbaren Gerinnungsfaktoren sollte es daher möglich sein, Veränderungen während der Blutkonservierung sehr frühzeitig zu erkennen.

Für die Klinik ist das Verhalten der Gerinnungsfaktoren in der Konserve nicht von so großer Bedeutung wie das Verhalten der Blutzellen. So soll auch dies hier beobachtet werden und zwar anhand ihrer Zahl, wobei wir

uns durchaus darüber im klaren sind, daß die Anzahl der einzelnen korpuskulären Elemente nicht schon ein direktes Maß für ihre funktionelle Unversehrtheit ist. Trotzdem lassen sich daraus Rückschlüsse ziehen, da ja dem Aufhören der Funktion einer Zelle immer ihr struktureller Untergang folgt. Die Art und die Geschwindigkeit, mit der dies geschieht, ist abhängig von den natürlichen Alterungsvorgängen sowie von Umwelteinflüssen. Zu den letzteren gehören u. a. die Oberflächenbeschaffenheit der Blutbehältnisse. Allerdings verändert sich nach den bisher vorliegenden Untersuchungen die Erythrocytenzahl in der Konserve nur langsam, so daß damit kein sehr empfindlicher Indikator für Veränderungen in der Konserve gegeben ist, vor allem, da die Erythrocytenzahl kein Maß für die funktionelle Unversehrtheit ist. Anders steht es mit den Leukozyten. Diese überleben in vitro nur wenige Tage.

Das Gerinnungssystem stellt durch sein feines Zusammenspiel einerseits und seine gute Überprüfbarkeit über größere Zeiträume andererseits einen empfindlichen Anzeiger für Veränderungen im Konservenblut dar. Es soll deshalb in dieser Arbeit besonders beobachtet werden.

Was ist nun bisher über die Veränderungen der einzelnen Komponenten in der Blutkonserve bekannt :

1.) Erythrozyten :

Die Angaben über die Haltbarkeit der Erythrozyten beziehen sich bei manchen Autoren auf die Anzahl pro mm^3 in der Konserve, bei manchen auf die Überlebenszeit im Empfängerorganismus. Andere ziehen ihre Schlüsse aus der Stoffwechselaktivität der Erythrozyten, und wieder andere beziehen sich auf ihre mechanische Resistenz oder die Spontanhämolyse. Durch diese verschiedenen Betrachtungsweisen und Versuchsprinzipien sind Vergleiche der Ergebnisse schwierig und können nur sehr vorsichtig gezogen werden.

DONHUE bzw. SCHEITLIEN fanden nach 26 - 30 Tagen Lagerung noch 50 % der Erythrozyten in Konservenblut. REISSIGL und ebenso KINDLER geben einen verstärkt einsetzenden Erythrozytenzerfall nach 20 Tagen an. FISCHER und Mitarb. konnten zeigen, daß durch Zusatz von Nukleosiden (Inosin, Adenosin und Guanosin) die Funktionstüchtigkeit erheblich länger erhalten bleibt. Nukleoside ermöglichen Zufuhr von Energie durch Umgehung der Hexokinase, die infolge der pH-Änderung durch die angereicherte Milchsäure nach 30 Tagen blockiert ist. Ebenfalls lebensverlängernd erwies sich nach FISCHER's Versuchen Prednisolon. Dieses soll auf die Zellmembranen wirken.

REISSIGL gibt an, daß der Zerfall der Erythrozyten in Plastikkonserven hinausgezögert wird.

2.) Die weißen Blutzellen :

Alle Autoren sind sich über die schlechte Konservierbarkeit der weißen Blutzellen einig. So fand LÖHR schon am 4. Tag morphologische Strukturveränderungen. Nach KEIBEL sind die Granulozyten leichter zu schädigen als die Lymphozyten. SCHMIEDER, LUTZEYER u. KNOLL geben an, daß nach 3 Tagen nur noch 50 % der Granulozyten vorhanden waren und nach 7 Tagen nur noch 10 %. Demgegenüber waren Lymphozyten noch nach 2-3 Wochen nachweisbar.

3.) Die Thrombozyten : (s.S. 9)

Der Abfall der Thrombozyten wird von verschiedenen Autoren mit differierenden Ergebnissen angegeben. Bei KLIEBSCH fanden sich nach 16 Tagen noch ca. 63 %, bei GROSS u. STAUFFENBERG nach 21 Tagen noch ca. 40 %. Dahingegen zählten SOULIER, LARRIEU u. WARTELE noch über 75 % nach 21 Tagen Lagerung. Auch die Angaben über die Beeinflussung der Konservierbarkeit der Plättchen durch verschiedene Oberflächen schwanken. MC ILVANI fand nach 1 Woche in Plastikbehältern noch 44 %, in Glas noch 36 %. Auch REISSIGL gibt eine bessere Haltbarkeit der Blutplättchen in Plastikbeuteln an. HARTMANN u. CONLEY sahen hingegen keinen Unterschied der Thrombozytenzahlen, wenn sie Blut 8 Tage in Flaschen mit benetzbarer und unbenetzbarer Oberfläche lagerten. Nukleoside und Prednisolon sollen die Lagerungsfähigkeit der Thrombozyten verbessern (FISCHER Mitarb.).

4.) Faktor III (Thrombokinase) :

SOULIER, LARRIEU u. WARTELE verzeichneten einen Anstieg der Thrombokinaseaktivität in den ersten 7 Tagen der Lagerung, die dann nach 3 Wochen wieder ihren Ausgangswert erreicht hat. GROSS fand eine relative Faktor III-Zunahme in Bezug auf die Anzahl der Thrombozyten pro ml in den ersten 14 Tagen der Lagerung.

5.) Faktor XII (Hageman-Faktor) :

Über das Verhalten des Hageman-Faktor findet sich nur wenige Literatur. In einer Zusammenstellung von J. S. WRIGHT wird eine Lagerungsfähigkeit von 12 Wochen in Oxalatplasma und von über 6 Wochen in Normalserum angegeben.

6.) Faktor VII (Proconvertin-Convertin) : (s.S.10)

Einer der stabilsten Faktoren bei Lagerung scheint der Faktor VII zu sein. Hier wurden Aktivitätsschwunde von 20 % in 16 Tagen von HALBERSTADT

und von KLIBSCH angegeben, während THIESS u. BOECKER den gleichen Schwund in einem Zeitraum von 2 Monaten feststellten. SOULIER u. Mitarb. fanden Faktor VII in 3 Wochen fast unverändert. Gleiche Angaben macht KOLLER.

7.) Faktor V (Proaccelerin) : (s.S. 9)

Über das Verhalten von Proaccelerin herrscht insofern eine gewisse Einmütigkeit als es der lagerungslabilste Faktor genannt wird. Über die Schnelligkeit der Abnahme differieren die Angaben. Nach KLIBSCH beträgt der Schwund ca. 55 % in 16 Tagen. HALBERSTADT fand im gleichen Zeitraum einen Abfall von 70 %. THIESS u. BOECKER konnten bei ihren Versuchen nach 10 Tagen nur noch weniger als 43 %, nach 3 - 6 Monaten weniger als 10 % nachweisen. Nach den Angaben von RAPAPORT, AMES u. MIKKELSEN sind nach 14 Tagen noch 75 %, nach 20 Tagen noch 56 % Proaccelerin vorhanden. Einen starken Abfall auf nur noch 20 % Faktor V-Aktivität in 3 Wochen fanden SOULIER, LARRIEU u. WARTELE.

8.) Faktor VIII (Antihämophiles Globin A) : (s.S. 9)

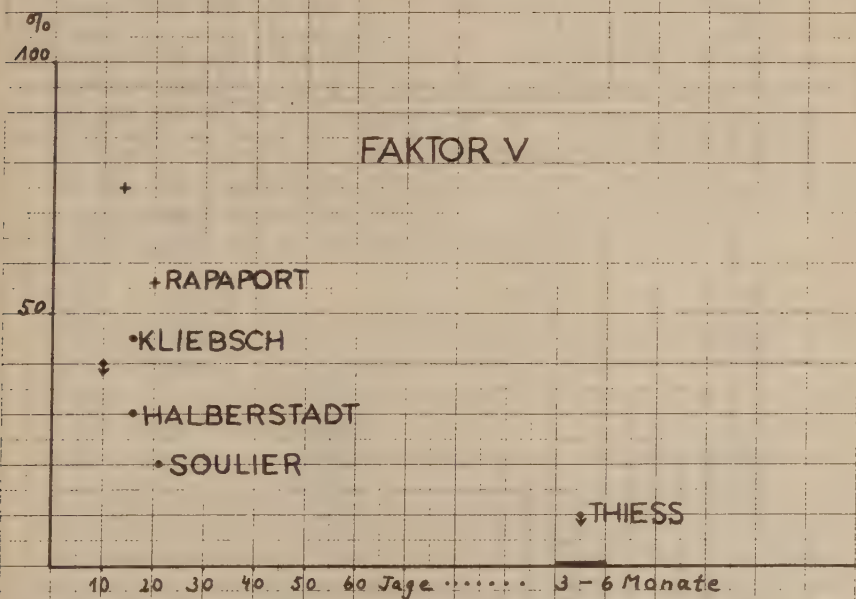
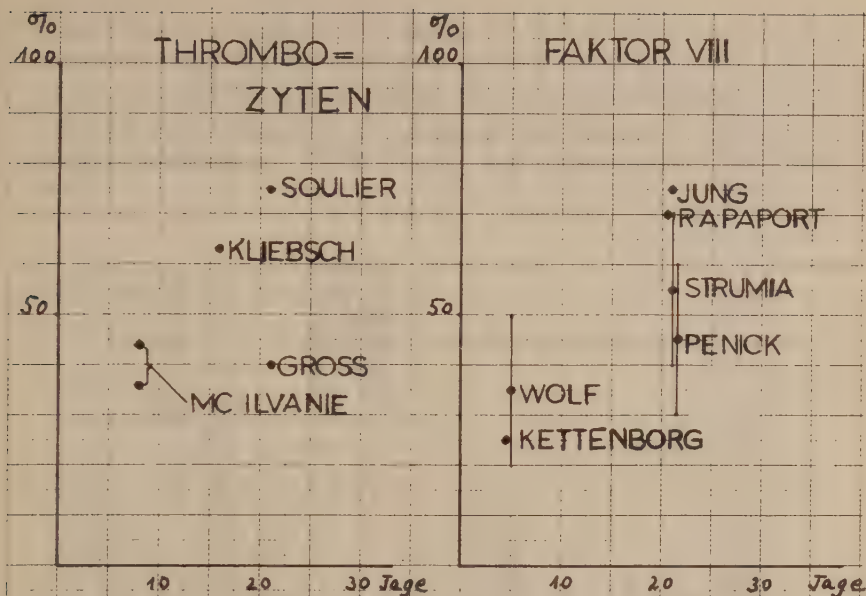
Auch bei diesem Faktor differieren die Angaben über die Lagerungsfähigkeit. So fand WOLF einen Aktivitätsschwund von 50 - 80 % in 5 Tagen, während STRUMIA in 21 Tagen einen Schwund von 30 - 60 % nachwies, RAPAPORT, AMES u. MIKKELSEN 30 % und JUNG 25 %. REISSIGL und KOLLER geben eine geringe Haltbarkeit des AHG an. KETTENBORG wies nach 3 - 5 Tagen nur noch 25 % in den Konserven nach, gleichgültig, ob sie siliconiert oder benetzbar waren. PENICK und BRINKHAUS gaben einen Schwund von 40 - 70 % nach 3 Wochen an.

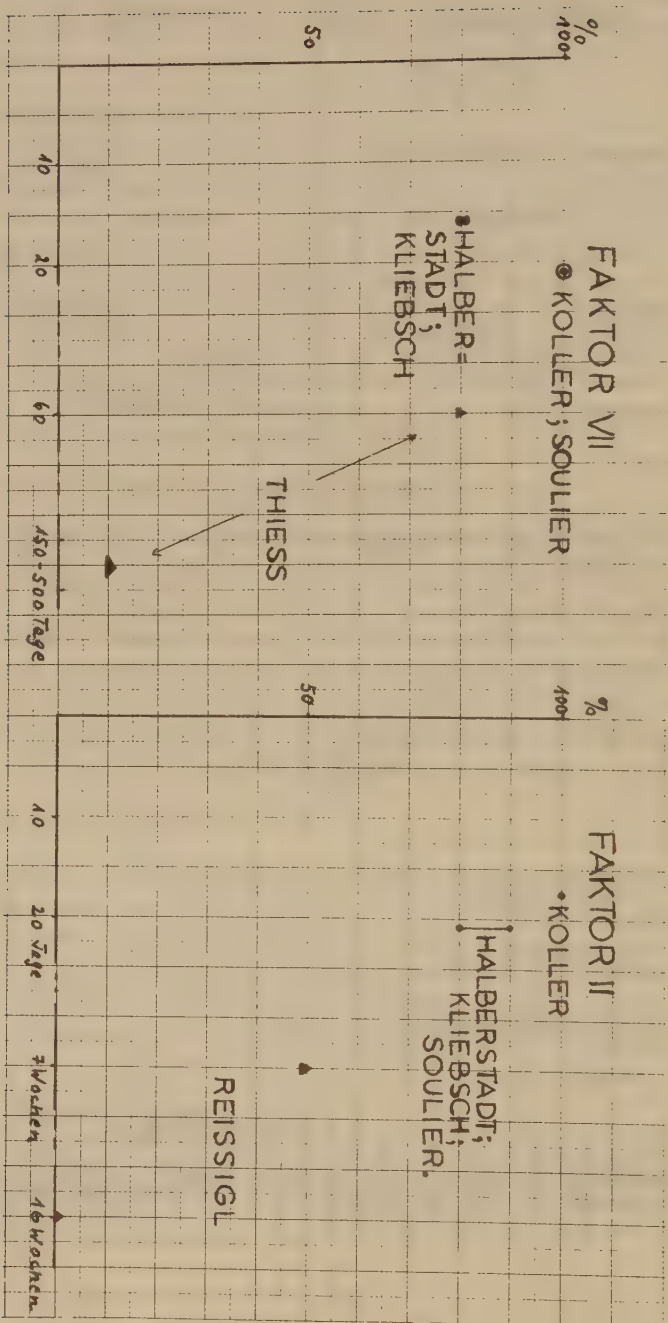
9.) Faktor II (Prothrombin) : (s.S. 10)

Die Ergebnisse verschiedener Autoren differieren etwas. KOLLER fand den Prothrombingehalt bei Lagerung über 2 1/2 Wochen unverändert. REISSIGL gibt an, daß dieser Faktor nach 3 Wochen abzufallen beginnt, nach 7 Wochen etwa 50 % des Ausgangswertes erreicht hat und nach 16 Wochen nicht mehr nachweisbar ist. Andere Untersucher fanden innerhalb von 3 Wochen einen Schwund von 10 - 20 % (HALBERSTADT, KLIBSCH, SOULIER u. Mitarb.).

10.) Profibrinolysin (Plasminogen) :

Über die Haltbarkeit des Plasminogen fanden wir keine Angaben in der uns zugänglichen Literatur.





11.) Thrombininhibitoraktivität :

Wie sich die Fähigkeit des Plasmas Thrombin zu inaktivieren verhält, wird sehr unterschiedlich beurteilt. Nach REISSIGL fällt sie bei der Lagerung etwas ab. Nach KLIEBSCH nimmt sie in den ersten 4 Tagen etwas ab, um nach 3 Wochen wieder zum Ausgangswert angestiegen zu sein. ALDE-HOFF, BRUNNER u. WEIDENBACH fanden einen Abfall innerhalb 10 Tagen.

METHODIK

Der Einfachheit halber seien hier zunächst die Reagenzien vorangestellt :

Stabilisator :

18,5 g Natr. Citr. neutr. · 2 H₂O

6,6 g Acid. Citr. · H₂O

20,0 g Sacch. amylac. · H₂O

ad 1000,0 ml Aqua bidest.

Pufferlösung :

100,0 ml n/10 Veronal-Na (=2,06%) mit HCl auf pH 7,6 eingestellt

100,0 ml NaCl 9 %

ad 1000,0 ml Aqua bidest.

Gealtertes Plasma :

Normales Menschenplasma (Citratstabilisator; 20 min bei 1000 g zentrifugiert) wird bei Zimmertemperatur 10 - 14 Tage mit Luft durchströmt. Ein Tropfen Octanol verhindert Schaumbildung. Nach dieser Behandlung wird das Plasma gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert. Die Substanz ist fast völlig frei von Faktor VIII.

Zum Gebrauch wird die gewünschte Menge in Puffer gelöst.

Faktor V:

Rinderoxalatplasma wird 15 min an BaSO₄ adsorbiert und dann 10 min bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wird unter leichtem Rühren mit bei Zimmertemperatur gesättigter Ammoniumsulfatlösung bis zu einer Konzentration von 34 % versetzt und nach weiterem 10 Minuten langem Rühren wieder zentrifugiert. Der jetzt gewonnene Überstand wird abermals mit Ammoniumsulfat jetzt bis zur Konzentration von 55 % gebracht und 15 min bei 300 g zentrifugiert. Der Niederschlag wird in Aqua bidest., dem einige ml physiologischer NaCl-Lösung beigegeben, gelöst und in 0,9 %iger NaCl-Lösung so lange dialysiert, bis keine Sulfat-Ionen mehr vorhanden.

All dies wird bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Alle Reagenzien außer der Ammoniumsulfatlösung werden vorgekühlt. Zum Schluß wird die Substanz gefriergetrocknet, bei -20°C gelagert und nach Bedarf gelöst.

Thrombokinase :

Die graue Substanz eines von seinen Häuten und Gefäßen befreiten Hirns wird entfernt und in Aceton fein zerrieben. Nun wird der Brei filtriert und mit Aceton nachgespült. Danach wird die Substanz vakuumgetrocknet und im Kühlschrank gelagert.

Zum Gebrauch löst man die gewünschte Menge in Pufferlösung, homogenisiert sie, inkubiert 5 min bei 37°C , zentrifugiert 3 min bei 100 g und verwirft den Satz.

Thrombokinase -Lipid :

1 g Thrombokinase (s. o.) wird 15 min in Chloroform gelöst und geschüttelt. Anschließend wird die Lösung 1 : 10 mit Aceton versetzt und scharf abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Bodensatz vakuumgetrocknet und im Eisschrank gelagert.

Zum Gebrauch wird die gewünschte Menge in Puffer gelöst und homogenisiert.

Prothrombin :

Ca. 35 l Oxalatblut (1 Teil Na-Oxalat, 1,37 % und 9 Teile Blut) werden 15 min bei 1000 g zentrifugiert und so das Plasma gewonnen. Dieses wird mit 35 g BaSO_4 15 min gerührt und dann der durch 15 Minuten langes Zentrifugieren bei 1000 g erhaltene Niederschlag zweimal mit Aqua bidest., einmal mit 0,9 %iger NaCl-Lösung, einmal mit 0,1 n Na-Oxalat gewaschen. Das sich dabei immer wieder durch 15 Minuten langes Zentrifugieren bei 1000 g ergebende Sediment wird zweimal mit je 300 ml Natr. -Citr. 5 % eluiert und das Eluat über Nacht gegen Aqua bidest. dialysiert. Danach wird es mit HCl auf ein pH von 5,9 gebracht. 10 min bei 1000 g zentrifugiert und der Überstand wieder mit HCl auf pH 4,6 eingestellt. Nach 10 min Zentrifugieren bei 1000 g wird der Niederschlag in 20 ml Aqua bidest. gelöst und mit NaOH auf pH 7,6 titriert, gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert.

Zum Gebrauch wird die gewünschte Menge in Puffer gelöst und homogenisiert. Da die Aktivität der Substanz im Laufe der Zeit nachläßt, müssen die optimalen Konzentrationen vor jedem Gebrauch neu ermittelt werden. (Siehe auch bei Thrombokinase-Bestimmung)

Siliconserum:

Nativblut wird in siliconierten Reagenzgläsern aufgefangen und bei 37°C in -

kubiert. Nach 35 min hat sich ein Blutgerinnsel gebildet, das mit einem siliconierten Glasstab aufgerührt und nach weiteren 2 - 3 min abzentrifugiert wird. Jetzt wird die in Serum und Koagulum getrennte Blutprobe weitere 3 - 4 Stunden bei 37°C inkubiert.

BaSO₄ - Plasma :

Oxalatblut (1 Teil Na-Oxalat, 1, 37 % und 9 Teile Blut) wird mit Silicontechnik gewonnen, 20 min bei 1000 g zentrifugiert und das Plasma in siliconierten Gläsern mit BaSO₄ (60 mg pro ml) 10 min bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Abzentrifugieren des BaSO₄ wird das gleiche mit 30 mg BaSO₄/ml wiederholt.

Das BaSO₄-Plasma muß jedesmal frisch zum Versuch hergestellt werden.

Al(OH)₃ -Plasma :

Gleiche Technik wie bei BaSO₄-Plasma bei Citratstabilisator.

Rindercitratplasma :

1 Teil Na-Citrat 3, 8 % auf 4 Teile Blut. Plasmagewinnung nach 20 min Abzentrifugieren bei 1000 g. Lagerung in einzelnen Portionen bei -20°C.

Zum Gebrauch taut man die benötigte Menge auf und filtriert sie.

Varidase : Firma Lederle

Sequestrenlösung :

Titriplex III (Merck)	1, 0 g
NaCl	0, 7 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

Cocainlösung :

Cocain hydrochloricum	3, 0 g
NaCl	0, 1 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

NaCl -Lösung 2 %

Reagenz zur Bestimmung von Prothrombin : Behring -Werke

Reagenz zur Bestimmung von Faktor V : Behring -Werke

Reagenz zur Bestimmung von Faktor VII : Behring -Werke

Fibrinogen : Behring -Werke

Thrombin : La Roche

Essigsäure-Gentianaviolett-Lösung nach Türk : Merck

BaSO₄, reinst, für Röntgenzwecke, Merck

Al(OH)₃, reinst, Merck

Silicon F : Firma Wacker, München

CaCl₂-Lösung m/40

Sammelserum

Glaswolle

Das Testplasma wurde nach 50 x - igem Umkippen der Blutprobe und Entnahme einiger ml zur Zellenbestimmung gewonnen durch 20 min Zentrifugieren bei 1000 g.

Die Messungen des Prothrombins, der Thrombokinas, des Proaccelerins, des Proconvertins, des Antihämophilen-Globins A, des Hageman-Faktors, der Thrombinhemmung und der Quick-Zeit wurden im Koagulometer nach SCHNITKER und GROSS vorgenommen.

Das Prinzip des Gerätes : Ein Häkchen wird im Abstand von 1 sec durch die Testsubstanz gezogen und stellt einen elektrischen Kontakt her, sobald ein Gerinsel daran hängenbleibt. Durch den Kontakt wird eine vorher in Gang gebrachte Uhr angehalten. Wir hatten bei zunehmend höherer Gerinnungszeit eine größer werdende Fehlerbreite : Bei Gerinnungszeiten unter 30 sec betrug sie ± 1 sec, bei Gerinnungszeiten über 150 sec ± 3 sec. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß bei langsamer Gerinnungsbildung - hohe Gerinnungszeiten - erst dann sicher der Kontakt hergestellt wird, wenn ein genügend starkes Gerinnungsbildung ist.

Gewinnung der Blutproben und Lagerung.

Glaskonserven : Aus der Armvene eines Spenders wurde in der üblichen Weise Blut in eine normale ACD-Glaskonserve ^{x)} entnommen. Für die Vergleichsreihe in PVC-Beuteln wurde das Blut in entsprechender Weise gewonnen.

Der weitere Fortgang war für beide Serien gleich : Der Inhalt der Konserven wurde unter Beachtung der Asepsis auf einzelne, evakuierte, sterile Glasröhrchen bzw. kleine Plastikbeutel verteilt, die jeweils 0,3 ml physiologische Kochsalzlösung enthielten. Die Proben wurden dann bei $+4^{\circ}$ C ruhig gela-

x) "ACD-Glaskonserve" = bisher übliche Blutkonserve in Glasflaschen zusammen mit ACD-Stabilisator.

gert. Für die Vergleichsreihe mit verschiedenen Zusätzen wurde das Blut von frischen, großen ACD-Glaskonserven (500 ml) zunächst in Glasflaschen von 100 ml Inhalt verteilt, in denen sich je 11 ml Stabilisator mit den entsprechenden Zusätzen befand und dann erst auf Glasröhrchen umgefüllt.

Die Zusätze waren :

1. ACD-Stabilisator ohne Zusatz (als Kontrolle),
2. Adenosin (Endkonzentration mit Blut 20 millimolar),
Guanosin (Endkonzentration mit Blut 0,5 millimolar),
Inosin (Endkonzentration mit Blut 0,5 millimolar),
3. Prednisolon (Endkonzentration mit Blut 0,1 millimolar),
4. Adenosin, Guanosin und Inosin wie in 2.
Prednisolon wie in 3.

Die Plastikbeutel bestanden aus Poly-Vinyl-Chlorid (PVC) ^{x)}

Bestimmung von Prothrombin, Accelerin und Proconvertin-Convertin.

Prinzip :

Der fragliche Faktor wird nach Inkubation der Reagenzien, die alle zur Gerinnung notwendigen Faktoren im Überschuß enthalten, außer dem zu messenden und Ca^{++} , in den Ansatz einpipettiert und die Zeit zwischen der Ca^{++} -Zugabe und dem Gerinnungseintritt gemessen. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Reagenzien :

Reagenz zur Bestimmung von Prothrombin

Reagenz zur Bestimmung von Faktor V

Reagenz zur Bestimmung von Faktor VII

CaCl_2 m/40

Aqua bidest.

Pufferlösung

Testplasma

Ausführung :

Die Ausführung ist für alle 3 Faktoren die gleiche.

Der Inhalt einer Ampulle des entsprechenden Reagenz wird mit 1 ml Aqua bidest. gelöst. 0,2 ml hiervon werden mit 0,2 ml Testplasma (1 : 20 mit Puffer verdünnt) 20 sec bei 37°C inkubiert. Dann wird 0,1 ml CaCl_2 hinzugefügt und die Gerinnungszeit im Koagulometer ermittelt.

x) Die Beutel wurden uns freundlicherweise von der Firma BIOTEST-SERUMINSTITUT, Frankfurt/Main zur Verfügung gestellt.

Bestimmung von Faktor VIII (Antihämophiles Globin A) n. E. G. JUNG.

Prinzip :

Das Testplasma wird in einer anhand einer Eichkurve als optimal ermittelten Verdünnung mit allen anderen Faktoren außer Ca^{++} im Überschuß inkubiert. Nach einer gewissen Zeit wird CaCl_2 dazupipettiert und der Zeitraum bis zum Gerinnungseintritt gemessen.

Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Reagenzien :

Gealtertes Plasma 200 mg %

Faktor V-Lösung 50 mg %

Thrombokinase-Lipid-Lösung 5 mg %

Sammelserum 1, 5 : 10 mit Puffer verdünnt

Testplasma 1 : 1 mit Puffer verdünnt

CaCl_2 m/40

Pufferlösung

Ausführung :

0,05 ml gealtertes Plasma

0,05 ml Faktor V

0,05 ml Thrombokinase-Lipid

0,05 ml Sammelserum

0,05 ml Testplasma

Dieser Ansatz wird 1 min bei 37°C inkubiert.

0,1 ml CaCl_2 wird dazugefügt.

Die Zeit zwischen der CaCl_2 -Zugabe und dem Eintritt der Gerinnung ist das Maß für die Aktivität des Faktors VIII in dem Testplasma.

Thrombokinase-Bestimmung

Prinzip :

In einem Gemisch, in dem sich alle Faktoren außer Fibrinogen und Thrombokinase im Überschuß befinden, ist die Thrombin-Bildung abhängig von der Thrombokinase des zugegebenen Testplasmas. Die Thrombinbildung wird an Fibrinogen in kurzen Intervallen getestet. Wir betrachteten den Gipfel der Thrombinbildung, also die kürzeste der Gerinnungszeiten, als ein Maß für die Thrombokinaseaktivität in dem Testplasma.

Reagenzien :

Sammelserum 1, 5 : 10 mit Puffer verdünnt

Faktor V-Lösung 200 mg %

Prothrombin-Lösung; die Konzentration wurde im Verlauf des Versuches kontinuierlich von 12 mg % auf 120 mg % erhöht, da das Prothrombin im Laufe

der Zeit an Aktivität verlor.

Thrombokinase-Lösung 100 mg %

CaCl_2 m/40

Fibrinogen-Lösung 300 mg %

Testplasma 1 : 20 mit Puffer verdünnt

Pufferlösung

Ausführung :

0,5 ml Testplasma

0,5 ml Sammelserum

0,5 ml Prothrombin

0,5 ml Faktor V

Dieser Ansatz wird 20 sec bei 37°C vorgewärmt.

0,5 ml CaCl_2 werden jetzt hinzugefügt und von diesem Ansatz im Abstand von 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 etc. min seit Zugabe des CaCl_2 je 0,2 ml zu je 0,1 ml Fibrinogen hinzugegeben und die Zeit zwischen dem Hinzupipettieren der Probe und dem Gerinnungseintritt gemessen. Es wird so oft gemessen, bis die anfänglich fallenden Gerinnungszeiten wieder ansteigen.

Da unser Prothrombin immer noch Spuren von Thrombokinase enthielt und wir die Konzentration des Faktor II wegen seines Aktivitätsverlustes während der Versuchsdauer erhöhen mußten, wurde je 1 Hauptwert mit Thrombokinase im Überschuß und ohne Testplasma im Ansatz und ein Leerwert ohne Testplasma gemacht. Die gegen Ende immer kleiner werdende Spanne zwischen beiden wurde bei der Auswertung berücksichtigt.

Die Messung der Thrombinhemmung (n. I. SCHMID)

Prinzip :

In einem standardisierten Thrombin-Fibrinogen-Gemisch wird die Gerinnungszeit durch die thrombinhemmenden Substanzen eines zugefügten Plasmas verlängert, wenn man das Thrombin vorher mit dem Testplasma inkubiert.

Die geeignete Plasma-Verdünnung wurde mittels einer Eichkurve am ersten Tag ermittelt.

Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Reagenzien :

Thrombinlösung 300 mg %

Fibrinogenlösung in einer Konzentration, die mit gleichen Teilen der Thrombinlösung bei 37°C eine Gerinnungszeit von 8 - 10 sec hat.

Pufferlösung

Testplasma 1 : 1 mit Puffer verdünnt

Ausführung :

0,2 ml Thrombinlösung werden mit 0,2 ml Testplasma 5 min bei 37°C inkubiert. Dann werden 0,2 ml dieses Gemischs zu 0,2 ml Fibrinogenlösung zupipettiert und die Zeit zwischen der Zugabe und dem Gerinnungseintritt gemessen.

Die Verlängerung der Gerinnungszeit über 8 - 10 sec ist ein Maß für die thrombinhemmenden Substanzen des Testplasmas.

Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Messung des Hageman -Faktors (n. H.EGLI und H.BUSCHA)

Prinzip :

Die Blutthrombokinasbildung wird durch intensiven Glaskontakt des Testplasmas beschleunigt. BaSO_4 -adsorbiertes und dann 30 min auf 56°C erhitztes Plasma, das außer dem Hageman-Faktor nur noch das Plasma-Thromboplastin-Antecedent enthält, kann immer noch die Thrombokinasbildung in mit Silicontechnik gewonnenem Plasma beschleunigen, wenn es mit Glas in Kontakt gebracht wurde.

Die Differenz in der Thrombokinasbildungszeit zwischen adsorbiertem und erhitztem Testplasma einmal mit Kontaktaktivierung und einmal ohne Kontaktaktivierung ist ein Maß für die Menge des darin enthaltenen Hageman-Faktors.

Die Adsorption mit BaSO_4 ist nur zweckvoll bei Oxalatplasma, bei Citratplasma wird sie entsprechend mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ durchgeführt.

Reagenzien :

BaSO_4 -adsorbiertes Siliconplasma, 1 Teil mit 4 Teilen Puffer verdünnt
Siliconserum

Thrombokinas-Lipid-Lösung 5 mg %

BaSO_4

$\text{Al}(\text{OH})_3$

Rindercitratplasma

Glaswolle

Pufferlösung

CaCl_2 m/40

Testplasma an $\text{Al}(\text{OH})_3$ adsorbiert

Siliconöl

Ausführung :

Einige ml des $\text{Al}(\text{OH})_3$ adsorbierten Testplasmas werden 30 min in ein Wasserbad von 56°C gebracht. Dann werden einige ml davon 5 min mit 60 - 70 mg/ml Glaswolle bei 37°C inkubiert. Sofort danach werden 0,2 ml davon mit 1,8 ml Siliconserum verdünnt und weitere 15 min lang auf 37°C erwärmt.

Die Aktivitätssteigerung wird jetzt gemessen indem das Inkubat zunächst 1 : 25 mit Puffer verdünnt wird und davon 0,4 ml zu 0,4 ml BaSO_4 -Plasma, 0,4 ml Lipid-Lösung und 0,4 ml CaCl_2 -Lösung gegeben und bei 37°C inkubiert werden. In diesem Ansatz findet nun Bildung von Thrombokinasestatt, die im Abstand von 2,5 min an Rindercitratplasma getestet wird. Zu diesem Zweck pipettiert man 0,2 ml des Ansatzes zu 0,2 ml Rindercitratplasma und mißt die Zeit zwischen dieser Zugabe und dem Gerinnungseintritt.

Jetzt wiederholt man die Messung von Anfang an mit gleicher Technik in dem Testplasma unter Auslassung der Glaskontaktaktivierung.

Die Profibrinolysebestimmung (n. MARBET, modifiziert)

Prinzip :

Der Eintritt der Fibrinolyse wird angezeigt durch das Herabfallen einer Glaskugel in einem Gläschen, in dem sich ein Gemisch aus Testserum, Rindercitratplasma, Thrombin und Varidase befindet.

Die optimale Verdünnung des Testplasmas wurde am ersten Versuchstag anhand einer Eichkurve festgestellt.

Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Reagenzien :

Rindercitratplasma

Varidaselösung 1000 E/ml Aqua bidest.

Thrombinlösung 80 mg %

Pufferlösung

Testplasma 1 : 1 mit Puffer verdünnt

Aqua bidest.

Weiterhin wird benötigt : 1 Glaskugel (ca. 170 mg), 1 Glasröhrchen ($\emptyset$ ca. 9 mm, Höhe ca. 45 mm) mit Markierung, eine Tuberkulinspritze.

Ausführung :

In dem mit einer Höhenmarkierung versehenen Gläschen liegt die Glaskugel. Darauf werden 0,1 ml Testplasma, 0,2 ml Rindercitratplasma und 1,5 ml Pufferlösung pipettiert und der Ansatz eine Minute bei 37°C vorgewärmt. Dann werden mit einer Tuberkulinspritze 0,1 ml Thrombinlösung plus 0,2 ml Varidase eingespritzt und gleichzeitig eine Stoppuhr in Gang gebracht. Nach 1 min wird das inzwischen verstöpselte Gläschen vorsichtig herumgedreht und die Uhr angehalten, wenn die Kugel durch die Markierung fällt.

Die Messung der Quick-Zeit

Prinzip :

Gibt man zu einem Plasma Thrombokinasest und Ca^{++} so ist die Gerinnungs-

zeit ein Maß für die Aktivität des gesamten Prothrombinkomplexes. Die optimale Verdünnung des Testplasmas wurde am ersten Versuchstag anhand einer Eichkurve ermittelt.

Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Reagenzien :

Thrombokinaselösung 100 mg %

Testplasma; 1 Teil auf 1 Teil Puffer

CaCl_2 m/40

Pufferlösung

Ausführung :

0,1 ml Testplasma und 0,1 ml Thrombokinaselösung werden 20 sec bei 37°C inkubiert. Dann wird 0,1 ml CaCl_2 hinzugefügt und die Zeit zwischen der Ca^{++} -Zugabe und dem Gerinnungseintritt gemessen.

Die Zählung der Erythrozyten

Nach Aufschütteln der Blutprobe wird in eine Erythrozytenpipette Blut bis zur Marke 0,5 aufgezogen und dann bis zur Marke 101 mit 2 % NaCl-Lösung weiterverdünnt, 2 min geschüttelt und nach Verwerfen der ersten Tropfen 2 Thoma-Kammern gefüllt und die Erythrozyten unter dem Phasenkontrastmikroskop in je 5 mittleren Quadraten ausgezählt. Ihre Zahl wird unter Berücksichtigung der Verdünnung errechnet.

Die Zählung der weißen Blutzellen

In eine Leukozytenpipette wird von dem aufgeschüttelten Blut bis zur Marke 1 aufgezogen und weiter mit Türk's Lösung bis zur Marke 11 verdünnt. Nach einigen Minuten Mischens sind die Erythrozyten hämolysiert und zwei Neubauer-Kammern werden nach Verwerfen der ersten Tropfen beschickt. Jetzt werden 4 große Quadrate ausgezählt und die Zahl der Leukozyten unter Berücksichtigung der Verdünnung errechnet.

Die Zählung der Thrombozyten (n. W. OSTEN)

Ein ml des aufgeschüttelten Blutes wird mit 1 ml Sequestrenlösung in Kunststoffröhrchen gemischt. Dann wird hiervon in einer Leukozytenpipette bis zur Marke 1 aufgezogen und mit Cocainlösung bis zur Marke 11 weiterverdünnt. Nach einer Wartezeit von 15 bis 20 min werden nach Verwerfen der ersten Tropfen 2 Thoma-Kammern beschickt und je 6 mittlere Quadrate ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung wird jetzt die Thrombozytenzahl ermittelt.

Das Differentialblutbild

Ein Tropfen des aufgeschüttelten Blutes wird auf einem Objektträger ausgestrichen und nach Papenheim wie folgt gefärbt :

Nach 3 min Fixieren mit May-Grünwald-Lösung fügt man eine gleiche Menge neutralisierten Aquae bidest. hinzu. Eine min später wird abgegos-
sen und ohne abzuspülen 15 min in frischer wäßriger Giemsa-Lösung gefärbt
und anschließend luftgetrocknet.

Na⁺ - und K⁺ -Bestimmungen wurden flammenfotometrisch durchgeführt.

Die Messungen des Hämoglobingehaltes wurden nach Überführung in Met-
hämoglobin fotometrisch vorgenommen.

Um Einflüsse durch Verkeimung auszuschließen, wurden von den Konser-
ven Proben abgeimpft auf :

1. Leberboullion
2. Standardboullion
3. Thioglycolatboullion
4. Sabouraud-Nährboden.

Die Nährböden 1 bis 4 wurden bei 20°C und die Nährböden 1 - 3 bei 37°C
nach 10 Tagen auf Keimwachstum geprüft. x)

x) Diese letzteren Untersuchungen wurden dankenswerter Weise in den
Laboratorien der Firma BIOTEST-SERUMINSTITUT, Frankfurt/Main
für uns durchgeführt.

Ergebnisse

I. Der Einfluß von Nukleosid- bzw. Prednisolon-Zusätzen.

In 4 Glaskonserven von denen eine nur normalen ACD-Stabilisator, die anderen außerdem noch Zusätze enthielten, wurde das Verhalten von Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor III und die Zahl der Thrombozyten beobachtet.

Die Zusammensetzung der Konserven-Zusätze ^{x)} :

I. ACD-Lösung

II. ACD-Lösung + Inosin, Adenosin u. Guanosin (JAG)

III. ACD-Lösung + Prednisolon

IV. ACD-Lösung + LAG + Prednisolon

Auf 100 ml Blut kamen 40 ml Stabilisator. Die Endkonzentrationen der zugesetzten Substanzen s. S. 15.

Die Veränderungen wurde zunächst am 1., 2., 5., 8., 12., 17., und 23. Tag beobachtet. In einer zweiten Serie wurden gleiche Konserven zwischen dem 20. und 90. Tag untersucht, diesmal jedoch in größeren Intervallen.

Die Faktor II-Aktivität :

	1.	2.	5.	8.	12.	17.	23.	Tag
I	53,5	52,5	53	55	55	56	56	sec. ^{xx)}
	28,5	29,5	29	27	27	26	26	% ^{xxx)}
II	54	54,5	54,5	56	56	57	58	sec.
	28	27,5	27,5	26	26	25	24	%
III	55	53	55	55,5	56	57	59	sec.
	27	29	27	26,5	26	25	23	%
IV	52	53	54	54,5	54	58	57	sec.
	30	29	28	27,5	27	24	25	%

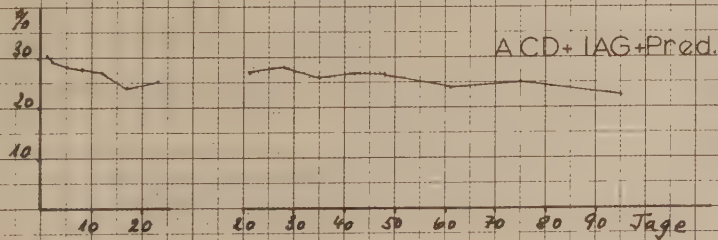
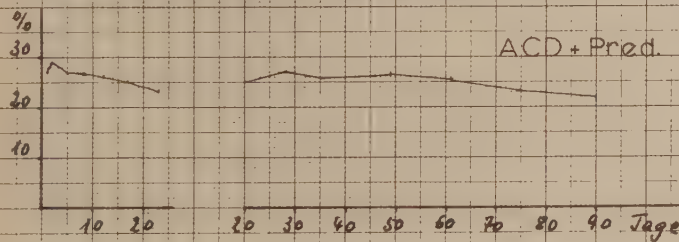
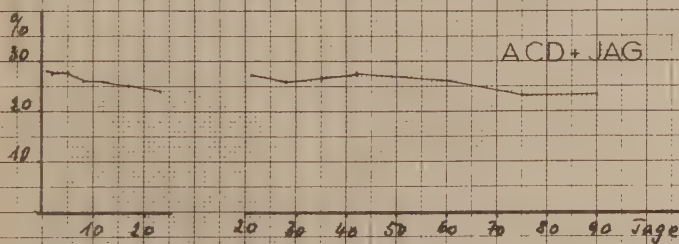
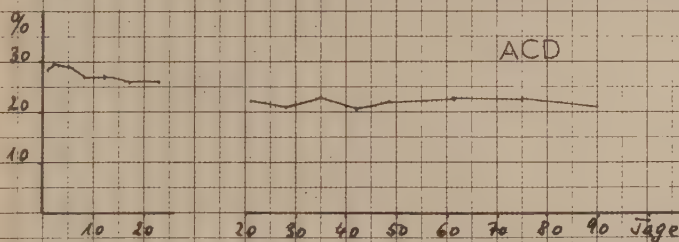
	21.	28.	35.	42.	49.	61.	75.	90.	Tag
I	60	61	59	63,5	61	60	60	63,5	sec.
	22,5	22	23	20,5	22	22,5	22,5	21	%
II	55	56	55,5	54,5	55	56	59,5	59	sec.
	27	26	26,5	27,5	27	26	23	23	%
III	57	55	56	56	55,5	56	59	62	sec.
	25	27	26	26	26,5	25,5	23	21,5	%
IV	54,5	54	56	54,5	54,5	58	57	60	sec.
	27,5	28	26	27,5	27,5	24	25	22,5	%

x) Die Zusammenstellung der Konserven wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. Fischer u. Mitarb. vorgenommen wofür wir ihm sehr danken.

xx) sec. = Gerinnungszeit

xxx) % = Aktivität nach Angaben der Behring-Werke, die den Reagenzien beiliegen.

FAKTOR II



FAKTOR V

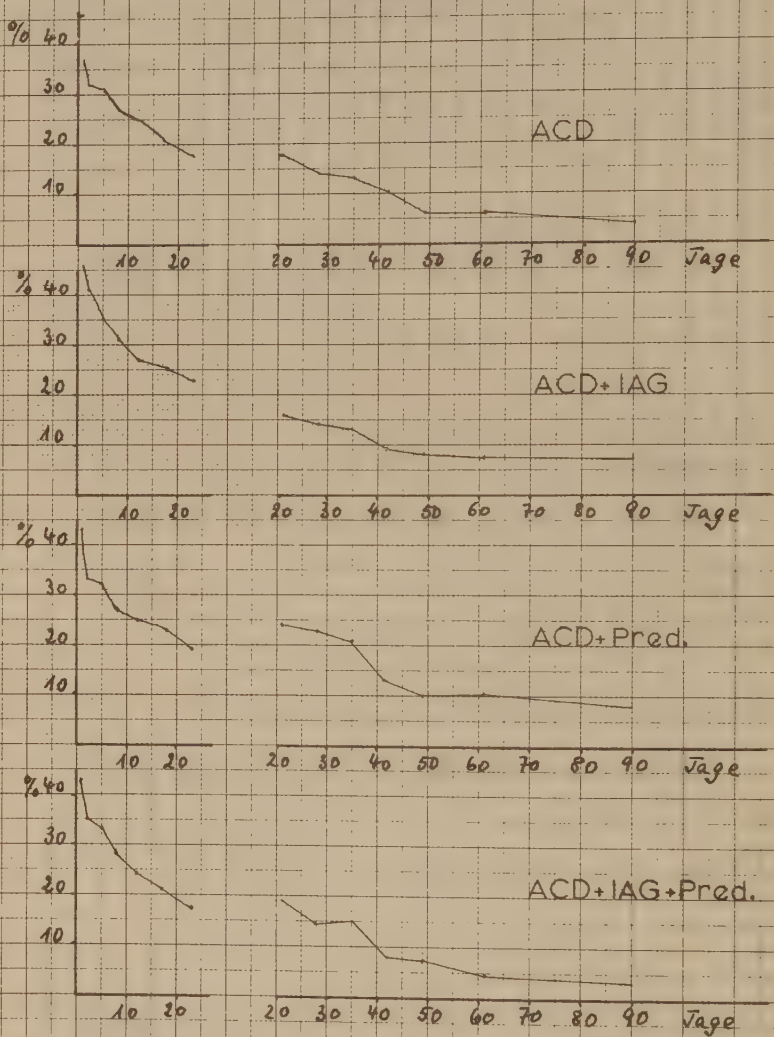


Abb. zur Faktor II-Aktivität s.S. 23.

Die Aktivität des Prothrombins war in allen Konserven in Anbetracht der Verdünnung mit Stabilisator von Anfang an niedrig. In allen Fällen trat ein geringer Prothrombinschwund auf. Innerhalb der Fehlerbreite waren keine auswertbaren Abweichungen zwischen den 4 geprüften Stabilisatoren zu verzeichnen.

Die Faktor V-Aktivität :

	1.	2.	5.	8.	12.	17.	23.	Tag
I	44,5	46	46,5	48	49	51	53	sec. ^{x)}
	37	32	31	27	25	21	17,5	% ^{xx)}
II	42,5	44	45	46,5	48	49	50	sec.
	46	41	35	31	27	25	23	%
III	43,5	45,5	46	48	49	50	52	sec.
	43	33	32	27	25	23	19	%
IV	43	45	45,5	47,5	49,5	51	53	sec.
	45	35	33	28	24	21	17,5	%

	21.	28.	35.	42.	49.	61.	90.	Tag
I	53	57	58	61	65	65	66,5	sec.
	17,5	14	13	10	6	6	4,5	%
II	53,5	57	58	62	63	63,5	63,5	sec.
	16	14	13	9	8	7,5	7,5	%
III	49,5	50	51	58	61	60	63	sec.
	24	23	21	13	10	10,5	8	%
IV	52	56,5	56	63	63,5	66,5	68	sec.
	19	14,5	15	8	7,5	4,5	3	%

Abb. zur Faktor V-Aktivität s.S. 24.

Von einer durch die Verdünnung bedingten niedrigen Ausgangsaktivität fiel die Konzentration des Proaccelerins in allen 4 Konserven in ähnlicher Weise ab. Dabei zeigte sich - innerhalb der Fehlergrenzen - kein differierendes Verhalten zwischen den 4 Stabilisatoren.

x) sec. = Gerinnungszeit

xx) % = Aktivität nach Angaben der Behring-Werke, die den Reagenzien beiliegen.

Die Faktor VII-Aktivität :

	1.	2.	5.	8.	12.	17.	23.	Tag
I	53	52, 5	56	55, 5	56	54	56	sec. ^{x)}
	31	31, 5	27	28	27	29	27	% ^{xx)}
II	53	53	54, 5	55, 5	56	56	55, 5	sec.
	31	31	28, 5	28	27	27	28	%
III	55	53, 5	55, 5	57	58	58	57, 5	sec.
	28	30, 5	27, 5	26	25	25	25, 5	%
IV	51	54	55	54	55	55	56	sec.
	32	29	28	29	28	28	27	%

	24.	35.	41.	49.	61	75.	90.	Tag
I	58	57, 5	59	58	62	61	61	sec.
	25	25, 5	24	25	21	21	21	%
II	54	57	54	55	56, 5	59	58, 5	sec.
	29	26	29	28	26, 5	24	24, 5	%
III	54	54	54	54	56, 5	57	57, 5	sec.
	29	29	29	29	26, 5	25	24, 5	%
IV	55	55	59	57, 5	59	57, 5	58, 5	sec.
	28	28	24	25, 5	24	25, 5	24, 5	%

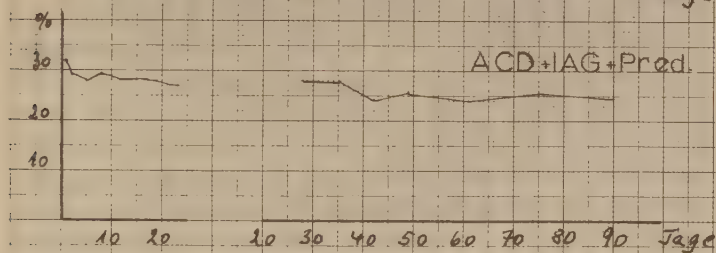
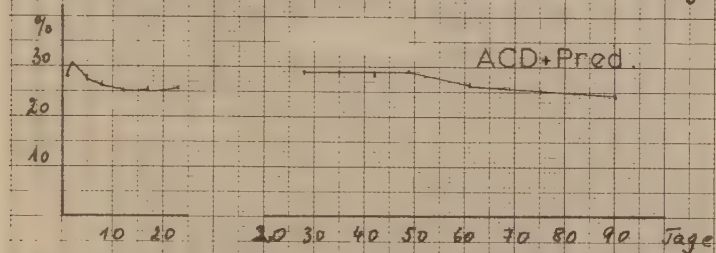
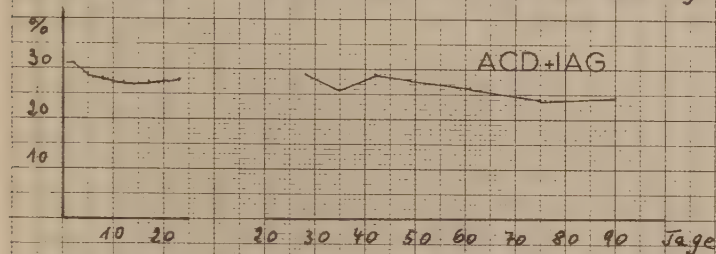
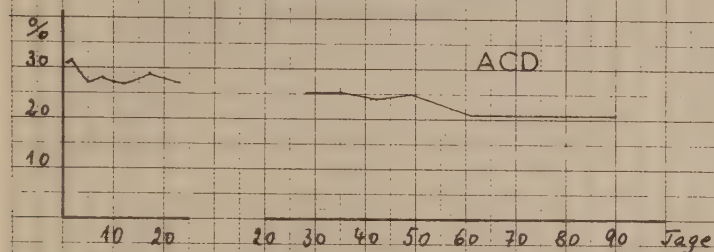
Abb. zur Faktor VII-Aktivität s. S. 27.

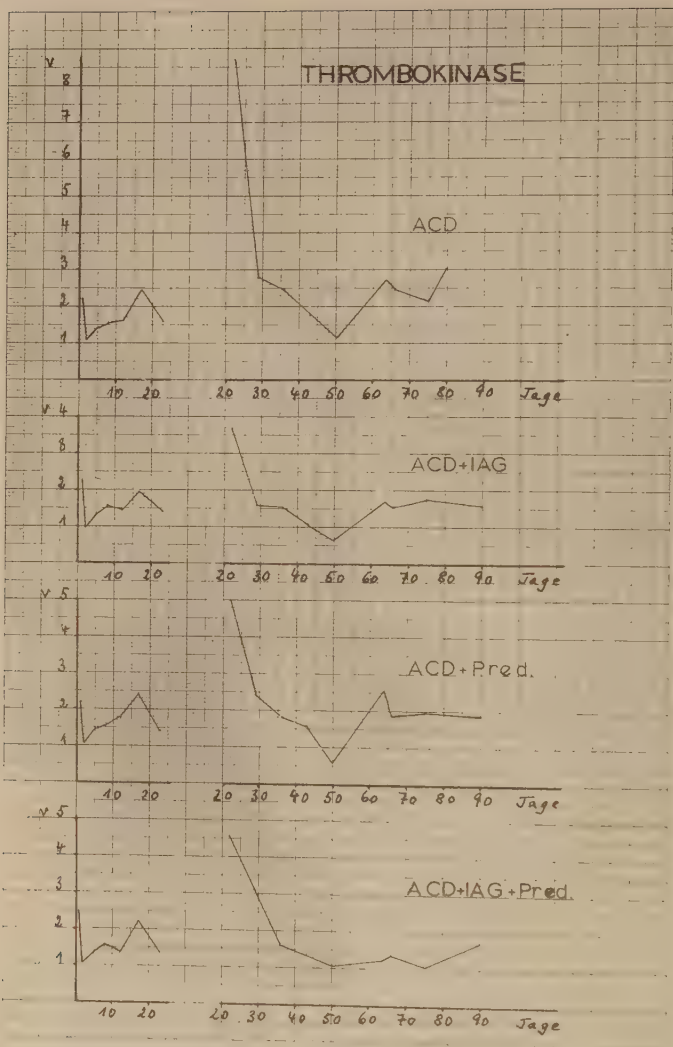
Von dem verdünnungsbedingten verringerten Anfangsniveau der Faktor VII-Aktivität kam es zu einem sehr geringen Abfall, der nicht von den verschiedenen Zusätzen beeinflusst wurde.

x) sec. = Gerinnungszeit

xx) % = Aktivität nach Angaben der Behring-Werke, die den Reagenzien beiliegen.

FAKTOR VII





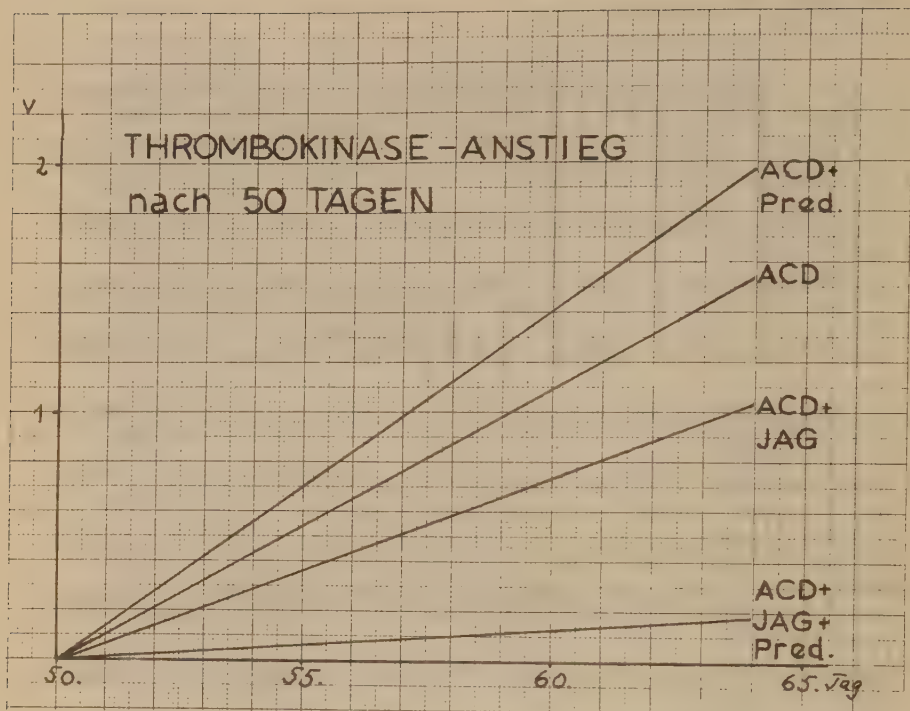
Die Faktor III-Aktivität :

	1.	2.	5.	8.	12.	17.	23.	Tag
I	45	90	71	65	62	41	63	sec.
	2, 22	1, 11	1, 41	1, 54	1, 61	2, 44	1, 59	100;GZ
II	44	102	75	65	71	51	72	sec.
	2, 27	0, 96	1, 33	1, 54	1, 41	1, 96	1, 39	100;GZ
III	45	94	71	65	56	41	71	sec.
	2, 22	1, 06	1, 41	1, 54	1, 78	2, 44	1, 41	100;GZ
IV	42	92	75	65	72	45	73	sec.
	2, 46	1, 09	1, 33	1, 54	1, 39	2, 22	1, 37	100;GZ

	22.	29.	36.	43.	50.	64.	66.	75.	90.	Tag
I	11, 5	36	41	58	86	37	41	37	33	sec.
	8, 7	2, 77	2, 44	1, 72	1, 16	2, 7	2, 44	2, 16	3, 03	100;GZ
II	27	63	64	98	153	60	65	58	64	sec.
	3, 7	1, 59	1, 56	1, 02	0, 65	1, 69	1, 54	1, 72	1, 56	100;GZ
III	20	41	55	60	171	39	54	51	53	sec.
	5, 0	2, 44	1, 82	1, 69	0, 59	2, 56	1, 85	1, 96	1, 89	100;GZ
IV	22	32	60	75	95	81	84	94	68	sec.
	4, 54	3, 12	1, 69	1, 33	1, 05	1, 23	1, 35	1, 07	1, 72	100;GZ

Abb. zur Faktor III-Aktivität s. S. 28.

Ein auffälliges Verhalten zeigte die Thrombokinasase. In der ersten Serie fiel die Aktivität zwischen dem ersten und zweiten Tag in allen 4 Konserven in etwa gleichem Maße von einem für alle 4 Proben ungefähr gleich hohen Ausgangswert ab, um dann ebenfalls unterschiedslos zum 17. Tag anzusteigen. Danach sank die Aktivität wieder. In der zweiten Serie war der Anfangswert der Konserve ohne Zusatz sehr hoch, in den anderen etwas geringer, jedoch höher als die Ausgangswerte der ersten Serie. 7 Tage später lag die Thrombokinasaseaktivität bedeutend niedriger. Dieser Abfall ging in den Konserven 1, 2 und 3 bis zum 50. Tag weiter. Dann stiegen die Werte dieser Proben wieder an. In der Kombinationskonserve mit IAG + Prednisolon fand sich ein eigentlich deutliches Wiederansteigen erst nach dem 75. Tag. (siehe Abb. S. 30).



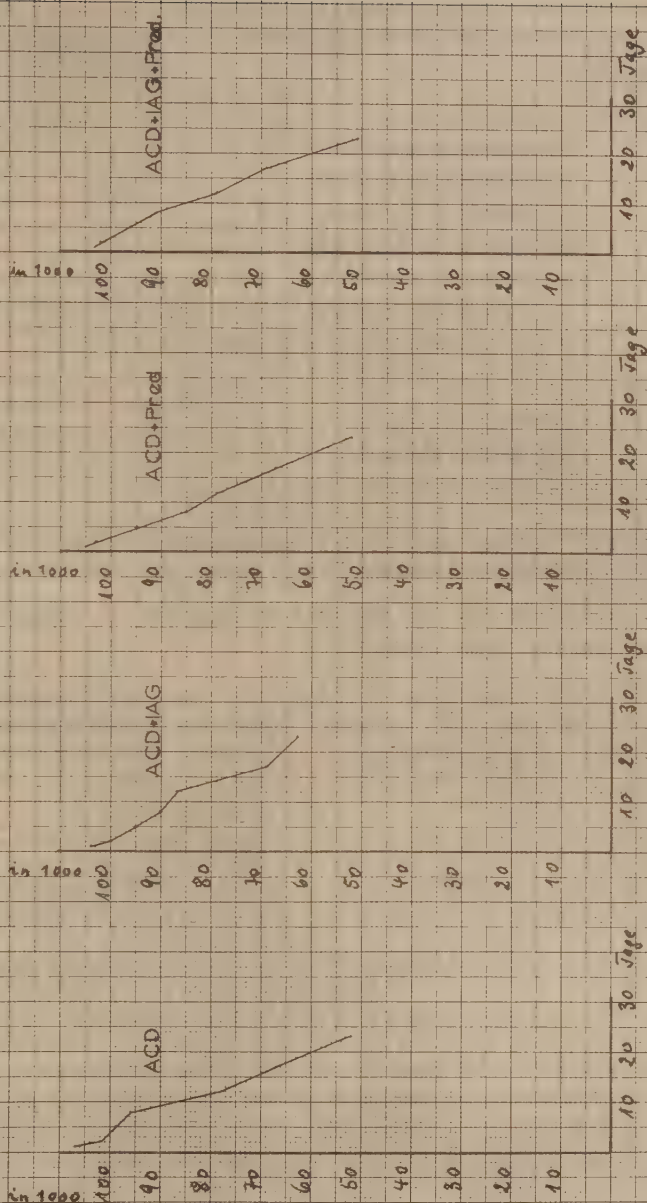
Die Zahl der Thrombozyten :

	1.	2.	5.	8.	12.	17.	23.		22.	29.	
I	107	102	99	96	78	67	52	x1000	74	70	
II	104	100	95	90	87	69	63	x1000	70	68	Trümmer
III	105	103	95	85	79	67	52	x1000	67	60	
IV	103	102	96	91	79	69	51	x1000	62	60	

Abb. zur Zahl der Thrombozyten s.S. 31.

Auch im Verhalten der Thrombozytenzahlen zeigten sich keine Einflüsse durch die Zusätze. Ihre Anzahl ging ziemlich gradlinig um ca. 50 % in 3 Wochen zurück. Danach trat ein Thrombozytenzerfall auf, der weiteres Zählen unmöglich machte.

THROMBOCYTEN



II. Unterschiede bei Lagerung in Glasflaschen und in Kunststoffbeuteln (PVC).

Über einen Zeitraum von 16 Wochen wurde bei Lagerung bei 4°C in Glasbehältern und in Polyvinylchloridbeuteln jeweils mit ACD-Stabilisator folgendes beobachtet :

Das Verhalten der Quick-Zeit,
 der Faktor II-Aktivität,
 der Faktor III-Aktivität,
 der Faktor V-Aktivität,
 der Faktor VII-Aktivität,
 der Faktor VIII-Aktivität,
 der Faktor XII-Aktivität,
 der Thrombininhibitor-Aktivität,
 des Profibrinolysins,

die Zahl der Erythrozyten,
 der weißen Blutzellen,
 der Thrombozyten.

Außerdem wurden am 1., 3., 5., 7., 9., 12. und 15. Tag Differentialblutbilder hergestellt und ausgewertet.

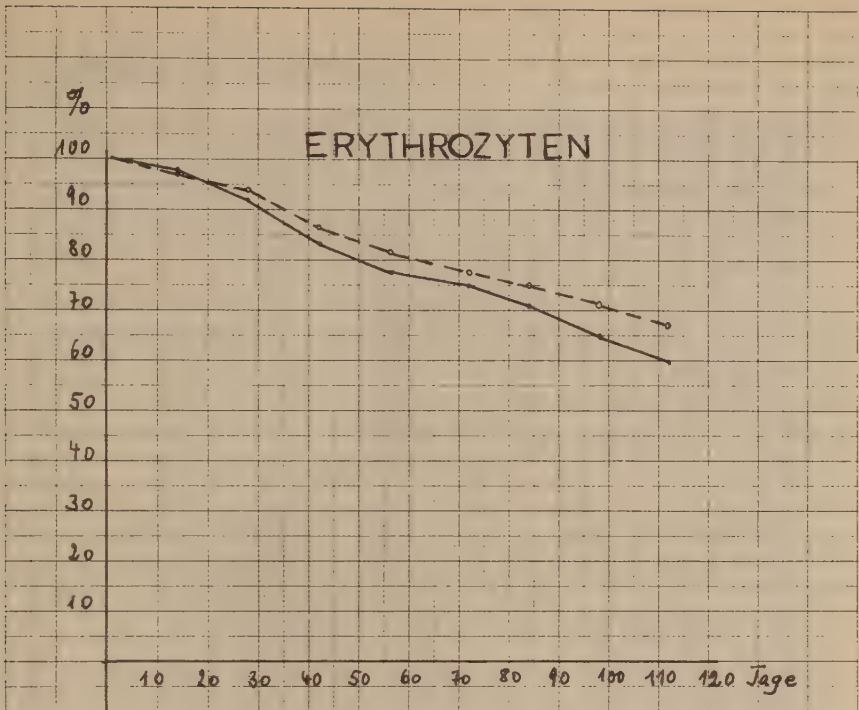
Dazu wurden noch der Na⁺, K⁺ und Hämoglobingehalt des Plasmas bei Versuchsanfang und -ende bestimmt.

Um Verkeimungen sicher auszuschließen, bzw. um auch hier einen Vergleich der Verkeimungsraten zu haben, wurden am letzten Tag entsprechende Untersuchungen durchgeführt.

Die Zahl der Erythrozyten :

	1	14	28	42	56	72	84	96	112	Tage
G	5,15	5,05	4,75	4,28	4,0	3,85	3,65	3,34	3,09	10 ⁶ /mm ³
	100	98	92	83,5	77,5	75	71	65	60	%
B	5,15	5,0	4,85	4,45	4,2	4,0	3,85	3,65	3,44	10 ⁶ /mm ³
	100	97	94,0	26,5	81,5	77,5	75	71	67	%

In beiden Konserven nahmen die Erythrozytenzahlen nahezu linear ab. Dabei fielen sie in der PVC-Konserve in 16 Wochen um 33 % des Ausgangswertes ab, in den Glasproben jedoch um 40 %. Außerdem konnte man in der herkömmlichen Konserve in den letzten Wochen reichlich Erythrozyten finden, die zwar unversehrt, jedoch ungefärbt waren. In der Kunststoffkonserve war der Anteil solcher Zellen weit geringer.



		1. Tag	112. Tag
Glaskonserve	Hb	87,7 mg %	6850,0 mg %
	Na ⁺	517,23 mg %	183,0 mg %
	K ⁺	10,92 mg %	153,0 mg %
PVC-Beutel	Hb	82,2 mg %	342,5 mg %
	Na ⁺	430,0 mg %	184,0 mg %
	K ⁺	12,32 mg %	157,0 mg %

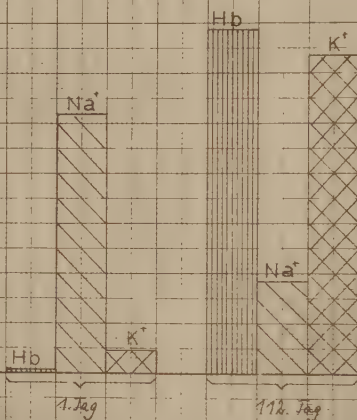
Die Hämoglobinkonzentration der Plasmen zeigte ein sehr unterschiedliches Verhalten : In der Glaskonserve stieg sie in 16 Wochen um etwa das 75-fache, während sie sich in den PVC-Beuteln nur etwa vervierfachte.

Die Na-Konzentration der Plasmen verhielt sich in beiden Konserven recht ähnlich, indem sie in 112 Tagen um etwa 2/3 absank. Allerdings war in der Kunststoffkonserve der Abfall ein klein wenig geringer.

Die K-Konzentration stieg in den Plasmen beider Konserven während der Versuchsdauer auf etwa das 15-fache.

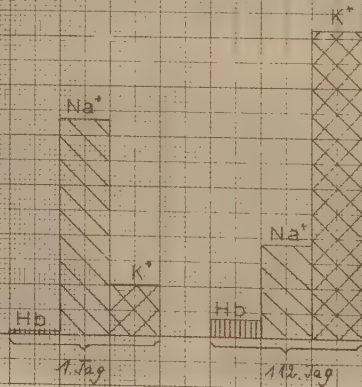
Glas

Hb	Na ⁺	K ⁺
mg%	mg%	mg%
6000	600	150
5000	500	
4000	400	100
3000	300	
2000	200	50
1000	100	



PVC

Hb	Na ⁺	K ⁺
mg%	mg%	mg%
5000	500	
4000	400	100
3000	300	
2000	200	50
1000	100	



Die Zahl der weißen Blutzellen :

	1	14	28	42	Tage
G	5100	4200	2850	1650	Zellen/mm ³
	98	81	55	32	%
B	5300	4450	2650	1600	Zellen/mm ³
	110	86	51	32	%

Die Zahl der weißen Blutzellen zeigte in den Konserven ein etwas unterschiedliches Verhalten. In 40 Tagen fielen sie auf 35 % des Ausgangswertes. In der PVC-Konserve betrug der Abfall ca. 12 % mehr, da ihr Anfangswert um 110 % lag, während die Glaskonserven am Anfang 98 % weiße Zellen hatten. Nach 6 Wochen war eine Zählung nicht mehr möglich, da die Zellen verklumpt und in Auflösung waren.

Abb. s. S. 37

Das Differentialblutbild :

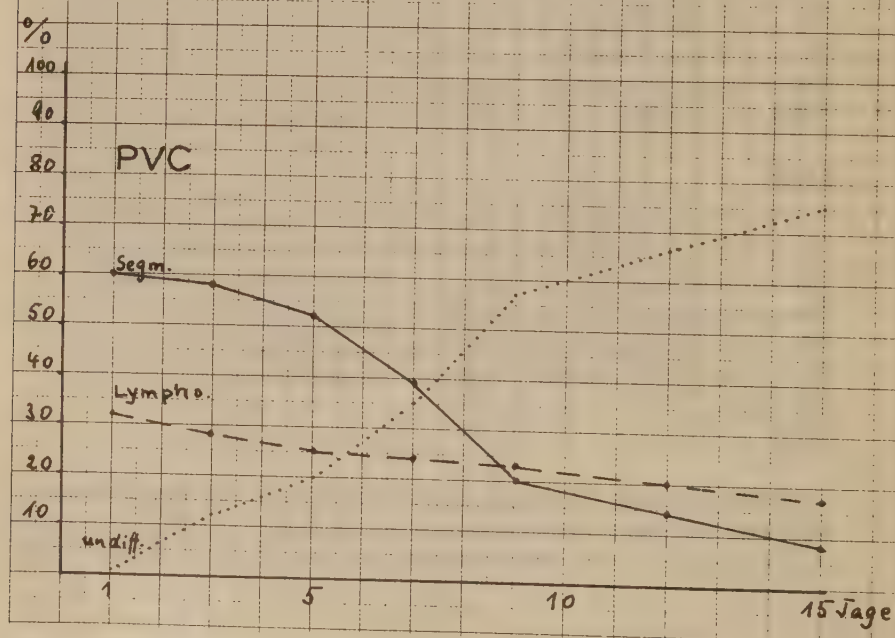
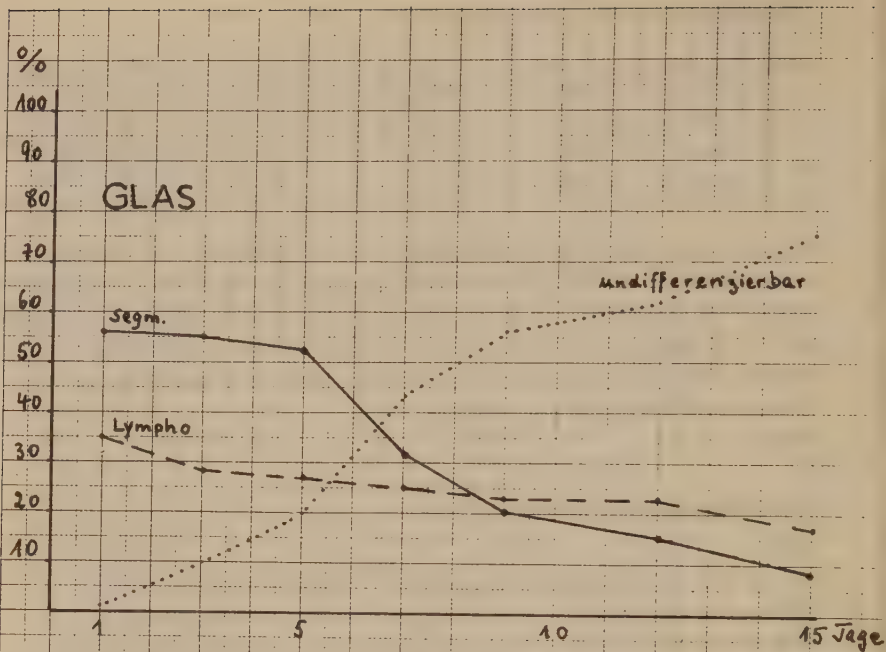
Glas

	1	3	5	7	9	12	15	Tag
Eos	2	2						
Jug	1	2						
St.	2	2	1					
Seg	56	55	52	32	20	15	8	
Ly	35	28	27	25	23	23	17	
Mo	3	1						
undiff	1	10	20	43	56	62	75	

Beutel

	1	3	5	7	9	12	15	Tag
Eos	1		2					
Jug	1			1				
St.	2							
Seg	60	58	52	39	20	14	8	
Ly	32	28	25	24	23	20	17	
Mo	3	2	1	1				
undiff	1	12	20	35	57	66	75	

Der Anteil der nicht differenzierbaren weißen Blutzellen stieg in beiden Konserven fast gleich von 1 % am ersten Tag über ca. 55 % am 9. Tag auf etwa 75 % am 15. Tag. Diese Zunahme des Anteils dieser Zellen, die we-



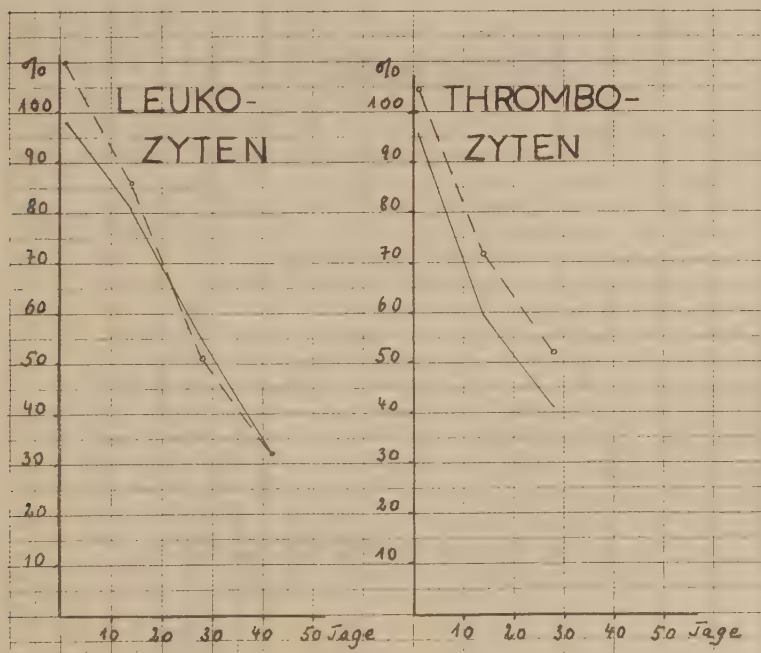
gen Pyknose oder Kernverdichtungen und Plasmaveränderungen nicht mehr sicher einer Art zugeordnet werden konnten, ging vor allem auf Kosten der Segmentkernigen, deren Anteil in 9 Tagen von 55 - 60 % auf ca. 20 % fiel und die nach 15 Tagen noch zu einem Gesamtanteil von 8 % vorhanden waren. Außer diesem Rest von Segmentkernigen und den viel resistenteren Lymphozyten, die von 30 - 35 % nach 15 Tagen nur auf ca. 17 % sanken, waren auch die anderen Zellarten des weißen Blutbildes nach 9 Tagen verschwunden.

Abb. s. S. 36.

Die Zahl der Thrombozyten :

	1	14	28	Tage
G	181	113	78	$\cdot 10^3/\text{mm}^3$
	95,5	59,5	41	%
B	198	135	98	$\cdot 10^3/\text{mm}^3$
	104,5	71,5	52	%

Die Thrombozytenzahlen der PVC-Konserve fielen in 4 Wochen um 52 %, die der Glaskonserve um 55 %. Nach 28 Tagen war ein weiteres Zählen nicht möglich, da die Plättchen z. T. zerfielen und da sich morphologisch intakte von solchen, die schon beschädigt waren, nicht mehr sichtbar unterscheiden ließen.

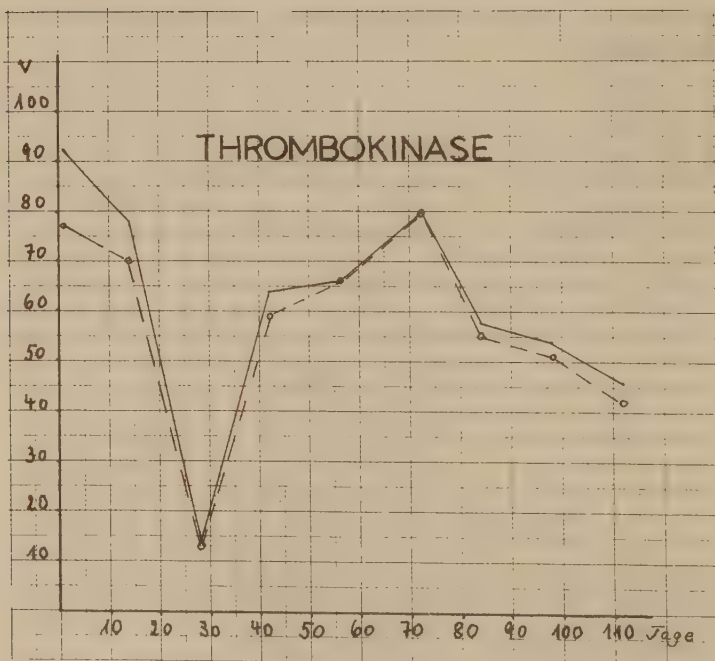


Die Thrombokinasen-Aktivität :

	1	14	18	42	56	72	84	98	112	Tage
G	21,5	25	92	30	29	30	45	48	45	sec.
	92	78	14	64	66	80	58	54	46	v
B	25,5	28	93	32	29	30	46	50	46	sec.
	77	70	13	59	66	80	55	51	42	v

$$v = \text{Gerinnungsgeschwindigkeit} = \frac{(100 : \text{Gerinnungszeit} - 100 : \text{Leerwertszeit}) \cdot 100}{100 : \text{Hauptwertszeit} - 100 : \text{Leerwertszeit}}$$

Stellt man das Verhalten der Thrombokinasen unter Berücksichtigung der sich ändernden Haupt- und Leerwerte graphisch dar, so zeigt die Glaskonserve einen höheren Ausgangswert als der PVC-Beutel. Beide verlieren stark an Faktor III-Aktivität und erreichen nach 4 Wochen einen Tiefstand. Um den 70. Tag haben sie in etwa ihren Ausgangswert wieder erreicht und fallen ab.



Die Aktivität des Hageman-Faktors :

	1.	14.	Tag
nicht aktiviert	35	75	sec.
	2,86	1,33	v
<u>Glas</u>			
aktiviert	36	76	sec.
	2,78	1,32	v

	1.	14.	Tag
nicht aktiviert	121	100	sec.
	0,82	1,0	v
<u>Beutel</u>			
aktiviert	39	69	sec.
	2,56	1,45	v

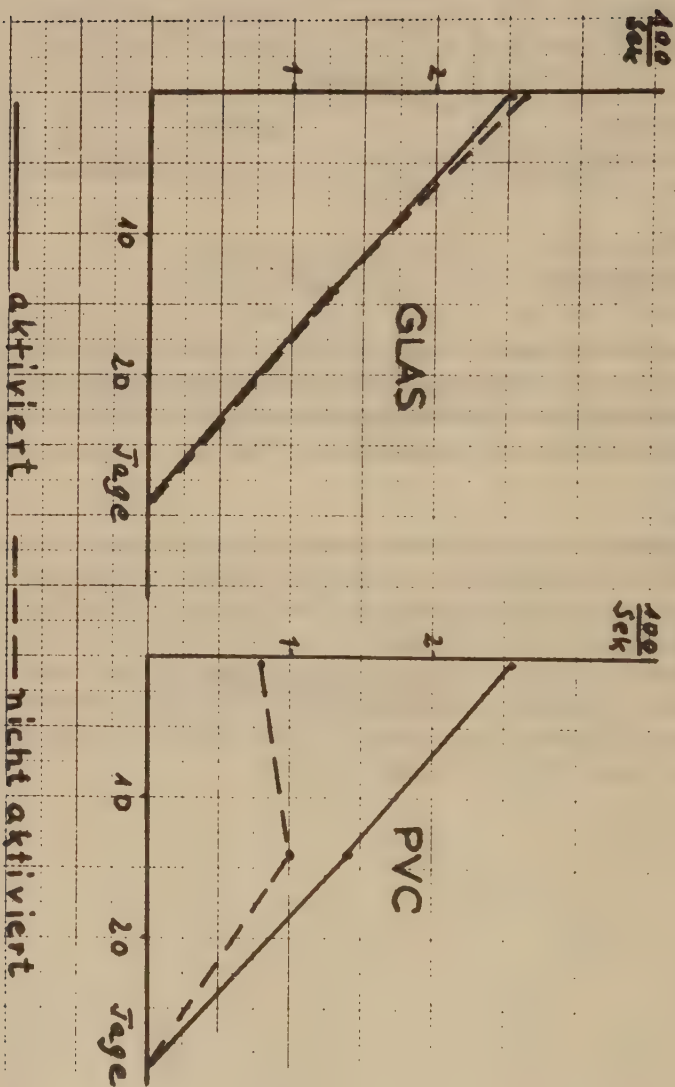
$$v = \frac{100}{\text{Gerinnungszeit}} = \text{Gerinnungsgeschwindigkeit}$$

Im Verhalten des Faktors XII zeigten sich große Unterschiede zwischen beiden Konserven. In der Glaskonserve war durch Behandlung mit Glaswolle keine Steigerung der Gerinnungsgeschwindigkeit zu erreichen. Sie sank in dieser Probe recht steil innerhalb von 28 Tagen auf unnachweisbare Werte.

Anders verhielt sich der Hageman-Faktor in der PVC-Konserve. Hier war am ersten Versuchstag mit Glaskontakt eine erhebliche Steigerung der Thrombokinasenbildungsgeschwindigkeit zu erreichen. Nach 14 Tagen war dieser Effekt auch noch zu beobachten. Jedoch war in Plasma, das noch keinen Glaskontakt gehabt hatte, die spontanaktive Hagemanfaktor-Aktivität erhöht. Die Aktivierbarkeit mit Glaswolle war andererseits weit geringer als bei Lagerungsbeginn. Nach 28 Tagen konnten wir auch in dieser Konserve keinen Faktor XII mehr nachweisen.

Abb. s. S. 40

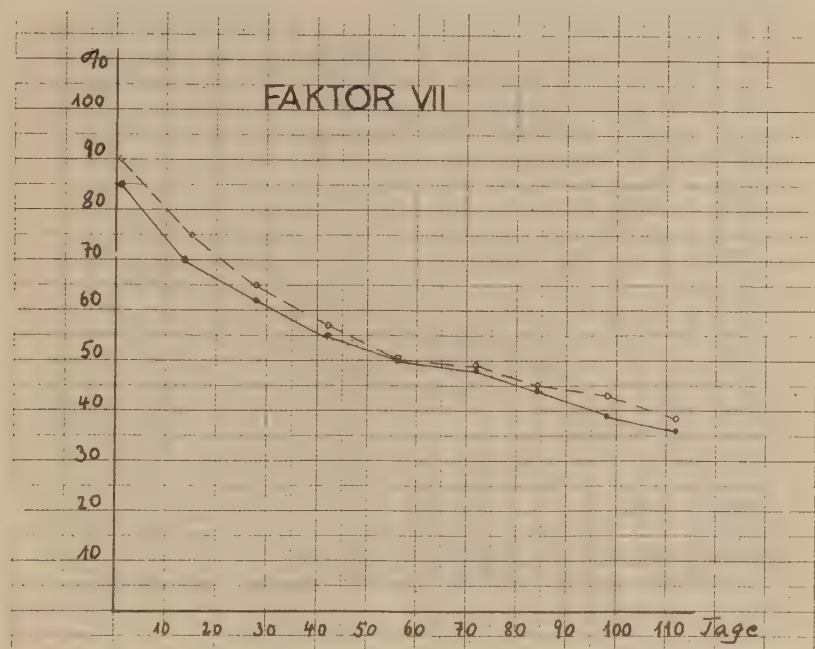
FAKTOR XII



Die Proconvertinconvertin -Aktivität :

	1	14	28	42	56	72	84	98	112	Tage
G	34	37	39	41	43	44	46	50,5	51,5	sec.
	85	70	62	55	50	48	44	39	36	%
B	33	35,5	38	40	43	43,5	44,5	46,5	48	sec.
	90	75	65	57	50	49	46	43	38	%

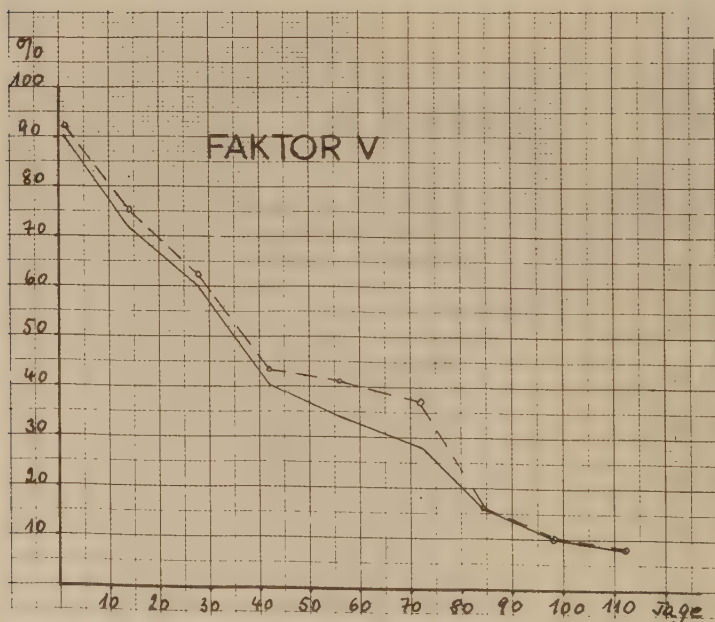
Auch hier war das Verhalten des Gerinnungsfaktors sowohl im Glas als auch im Beutel gleich. Beide erreichten 50 % Aktivität am 55. Tag ausgehend von einem um nur 5 % differierenden Ausgangswert von 85 bzw. 90 %. Nach 112 Tagen war die Faktor VII-Aktivität auf 35 bzw. 40 % gesunken, was einem Aktivitätsverlust von etwa 50 % entspricht.



Die Proaccelerinaktivität :

	1	14	28	42	56	72	84	98	112	Tage
G	37,5	38	40,5	44	46,5	48	55	60	62	sec.
	90	72	60	40	34	28	16	10	8	%
B	37	38,5	40	43	45	48,5	56	61	63	sec.
	92	75	62	43	41	27	16	10	8	%

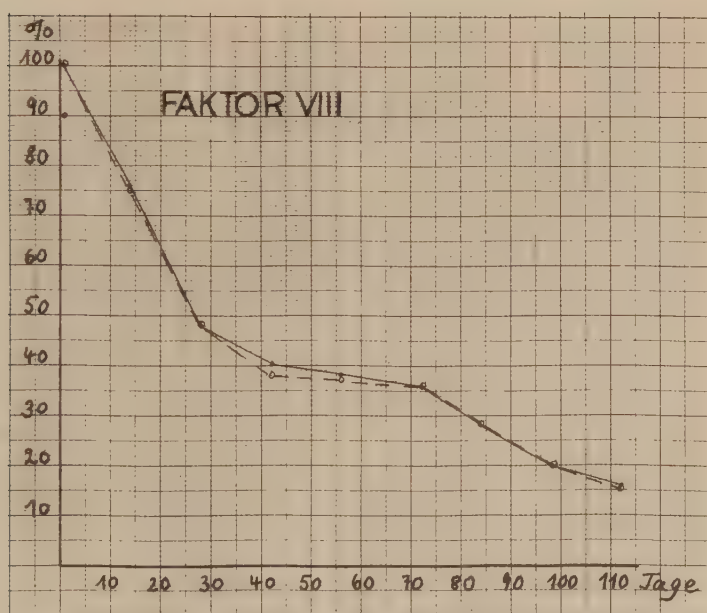
Der Ausgangswert lag für beide Konzentrationen um 90 - 92 Prozent. Während der Lagerung fiel die Faktor V-Aktivität in beiden etwa parallel in schneller Weise - ähnlich der Quickzeit - ab. Nach 35 Tagen lag sie um 50 %, nach 100 Tagen um ca. 10 %.



Die Aktivität des Antihämophilen-Globins A:

	1	14	28	42	56	72	84	98	112	Tage
G	85	101	114,5	117	123	128,5	135	144	157	sec.
	100	76	48	40	38	36	28	20	16	%
B	83	103,5	117,5	123	126	130	139,5	147	166	sec.
	100	75	48	38	37	36	28	20	15	%

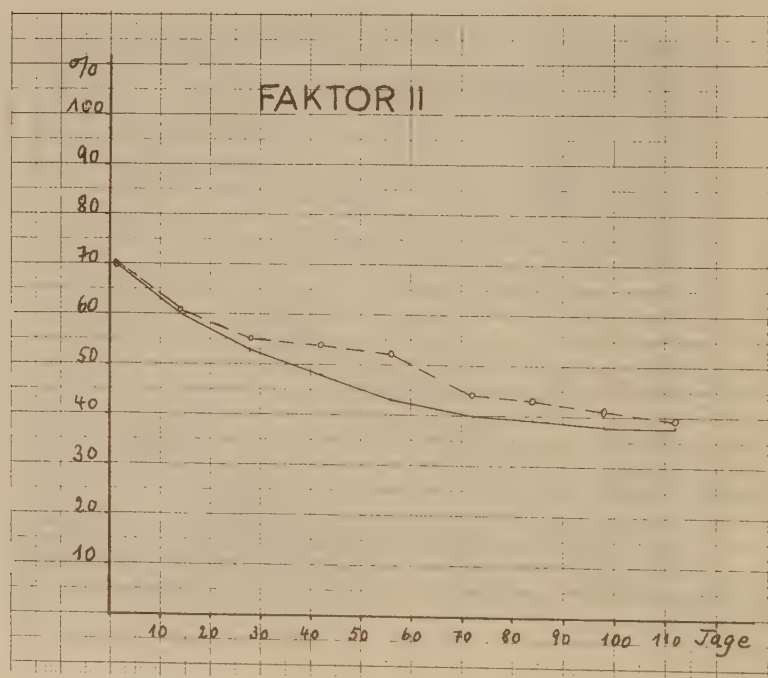
Das Absinken der Aktivitäten des Faktor VIII war in beiden Konserven von Versuchsanfang bis zum Ende gleich. In den ersten 30 Tagen sanken sie steil um 50 % des Ausgangswertes ab, um nach 112 Tagen noch 15 % zu betragen.



Die Prothrombinaktivität :

	1	14	28	42	56	72	84	98	112	Tage
G	34	37	39	41	43,5	44,5	45,5	46	46	sec.
	70	60	53	48	43	40	39	38	38	%
B	34,5	36	38	38,5	39,5	43	43,5	44	45,5	sec.
	70	61	55	54	52	44	43	41	39	%

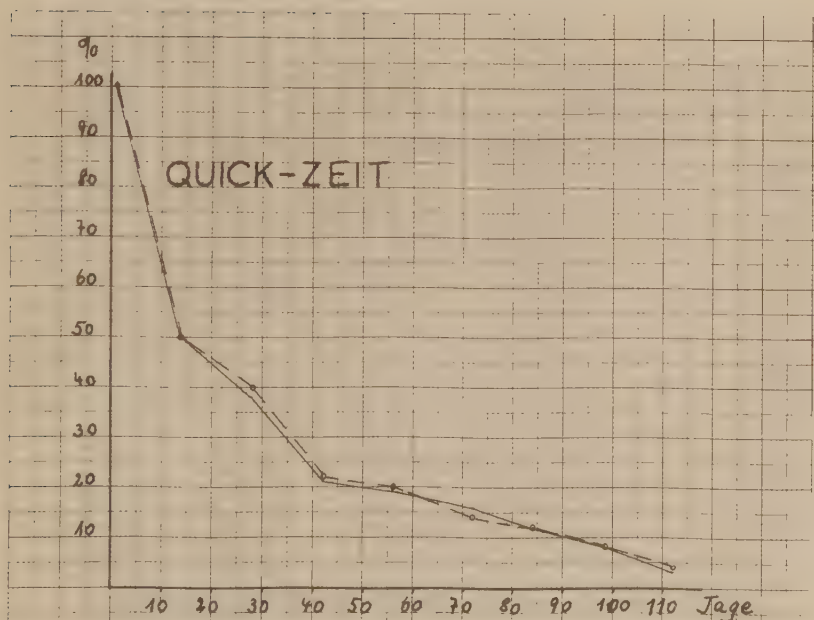
Von einer Ausgangskonzentration von 70 % fiel die Aktivität in 25 Tagen auf ca. 55 %. Nach 112 Tagen war sie in beiden Proben um insgesamt 30-35 % gefallen. Es trat zwischen dem 30. und 80. Tag der Lagerung ein um einiges geringerer Abfall des Prothrombins in der Kunststoffkonserve auf. Nach 112 Tagen lagen jedoch die Werte beider Proben wieder fast auf gleicher Höhe.



Die Quick-Zeit :

	1	14	28	42	56	72	84	98	112	Tage
G	46	56	62	68	68,5	70	75	83	91,5	sec.
	100	50	38	21	19	16	12	8	3	%
B	48	58	61,5	67	68	71,5	74,5	85	88	sec.
	100	50	40	22	20	14	12	8	4	%

Nach 14 Tagen Lagerung war die Aktivität des Prothrombinkomplexes auf etwa 50 % des Ausgangswertes gefallen. Um den 35. Tag war sie bis unter 25 % gesunken und nach 112 Tagen lag sie unter 5 %. Es waren keine Unterschiede im Verhalten der Quickzeit in Glas bzw. Kunststoff-Beuteln festzustellen.



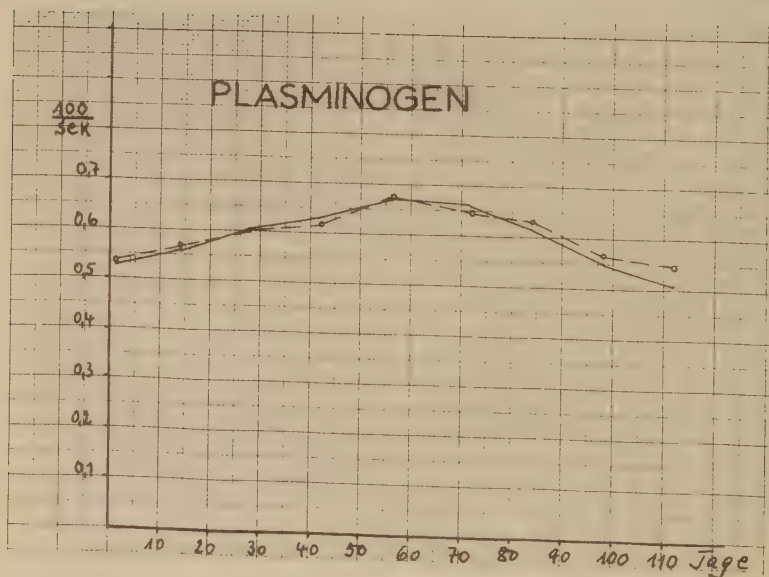
Plasminogen :

	1	14	28	42	56	72	84	98	112	Tage
G	189	179	165	160	150	151	162	181	197	sec.
	0,53	0,56	0,61	0,63	0,67	0,66	0,62	0,55	0,51	v
B	183	175	166	163	149	155	159	177	183	sec.
	0,55	0,57	0,6	0,62	0,67	0,65	0,63	0,57	0,55	v

$$v = \frac{100}{\text{Gerinnungszeit}} = \text{Gerinnungsgeschwindigkeit.}$$

Die Konzentration des Plasminogens steigt langsam an und hat zwischen dem 50. und 60. Tag die höchsten Werte erreicht. Nach 16 Wochen ist sie wieder auf die Ausgangswerte zurückgegangen.

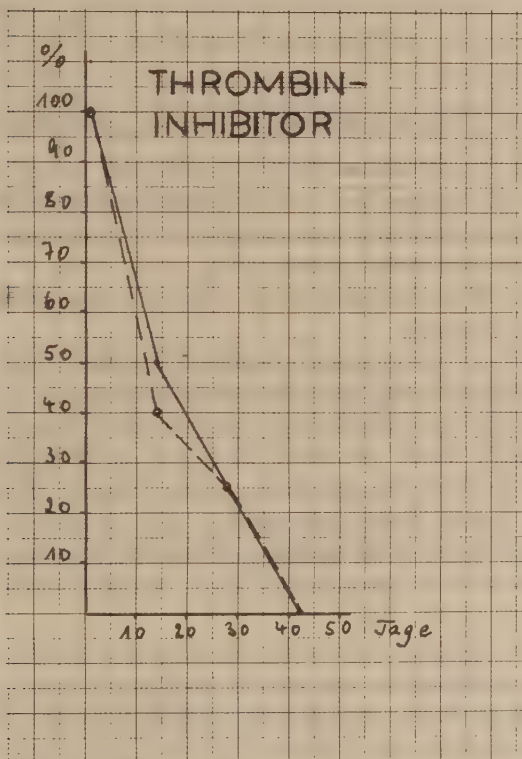
In Glas und PVC-Konserve zeigt das Profibrinolysin kein unterschiedliches Verhalten.



Die Thrombininhibitoraktivität :

	1	14	28	42	56	Tage
G	16	14	12	10	10	sec.
	100	50	25	0	0	%
B	16	14,5	12	10	9,5	sec.
	100	40	25	0	0	%

Die Fähigkeit des Plasmas, Thrombin unwirksam zu machen, nimmt sowohl in der Glas- als auch in der Kunststoffkonserve ab. Nach zwei Wochen ist sie nur noch zu 40 - 50 % der Anfangsaktivität vorhanden und nach 6 Wochen ist sie völlig verschwunden.



Diskussion

I. Zusatz von Nukleosiden und von Prednisolon.

Zusatz von IAG (Inosin, Adenosin, Guanosin) und Prednisolon ist in der Lage, die Konservierbarkeit der Erythrozyten deutlich zu verlängern. Da die Überlebenszeit der Erythrozyten jedoch kein zuverlässiger und feiner Indikator für das Verhalten aller Blutbestandteile während der Konservierung darstellt, sollte auch das Verhalten der Plasmaproteine auf Zusatz von IAG und Prednisolon untersucht werden.

IAG-Zusatz dient dazu, für die Energiegewinnung verwertbares Material in die Erythrozyten einzuschleusen.

Der Erhaltungsmechanismus der Erythrozyten ist aber völlig verschieden von dem der Plasmaproteine. Bei diesen handelt es sich entweder um die thermische Stabilität oder um die Resistenz gegen den fermentativen Abbau. Es war daher nicht zu erwarten, daß IAG-Zusatz einen erkennbaren Einfluß haben werde.

Tatsächlich ist auch kein Effekt zu erkennen, bis auf die Thrombokinase.

Nun bildet sich aber die Thrombokinase aus dem Produkt des Zerfalls von a) Thrombozyten und b) Erythrozyten. Daß Thrombozyten beim Zerfall Thrombokinase-aktives Material, insbesondere den Thrombozytenfaktor 3 abgeben, konnte G. WALTHER zeigen.

Bei ruhenden Konserven erfolgt innerhalb von 20 Tagen nur eine ganz geringe Thrombokinase-Aktivierung.

Ein Einfluß von IAG ist nicht zu erkennen, offenbar als Zeichen dafür, daß erst die mechanische Beanspruchung, etwa bei der Transfusion, zu zerstörten Erythrozyten und damit zur Thrombokinase-Abgabe führt. Das geht deutlich aus den Versuchen hervor, bei denen die Konserven 20 Tage ruhig gelagert und anschließend durch Einsaugen in evakuierte Röhrchen in einzelne Portionen unterteilt wurden. Diese "Transfusion" führt zu einer so erheblichen Belastung, daß Erythrozyten zerstört und dadurch Thrombokinase-aktive Stoffe freigesetzt werden, erkennbar an den 2. Ausgangswerten an Thrombokinase-Aktivität am 20. Tag.

Hierbei ist aber nun eine deutliche Schutzwirkung durch IAG zu erkennen. Die 20 Tage gelagerten Erythrozyten sind inzwischen viel anfälliger geworden, da ihr Stoffwechsel schon sehr reduziert ist. In Gegenwart von IAG ist ihr Stoffwechsel und damit auch ihre Stromastruktur noch weitgehend erhalten. Daher werden deutlich weniger Erythrozyten zerstört und somit auch

weniger Thrombokinas-Aktivität freigesetzt.

Läßt man diese Konserven weiterhin ruhen, dann tritt zwischen dem 50. und 70. Tag eine deutliche Thrombokinas-Aktivierung auch in der Ruhe auf. Auch diese Ruhe-Aktivität ist in den Konserven, die IAG enthalten, deutlich niedriger.

Prednisolon soll als oberflächenaktives Material an der Zellwand angelagert werden und diese vor mechanischen Schädigungen schützen. Auch hiervon war für die plasmatischen Gerinnungsfaktoren nichts zu erwarten.

Bei frischen Konserven hat Prednisolon ebenso wie IAG keinen Einfluß auf die Thrombokinas.

Bei 20 Tage alten Konserven schützt Prednisolon dagegen vor mechanischer Zerstörung der Erythrozyten und damit vor der Freisetzung von Thrombokinas-aktivem Material, jedoch nicht so wirksam wie IAG. Dasselbe trifft zu bei der spontanen Thrombokinasaktivitätszunahme zwischen dem 50. und 70. Tag.

Die Kombination von Prednisolon und IAG zeigt bei frischen Konserven ebenfalls keine Wirkung und vermag die Freisetzung von Thrombokinas-aktivem Material bei der mechanischen Belastung am 20. Tag auch nicht besser zu verhindern als IAG und Prednisolon allein. Dagegen wird Thrombokinas-Aktivierung während der ruhigen Periode zwischen dem 50. und 70. Tag durch die Kombination von IAG und Prednisolon fast ganz verhindert. Dieser Effekt ist auffallend eindeutiger als der von IAG und Prednisolon allein.

Die Thrombozytenzahl wurde durch die Zusätze von Prednisolon und IAG nicht beeinflußt. Hierbei ist zu beachten, daß diese Versuche nur mit ruhenden Konserven ohne mechanische Belastung durchgeführt wurden. Es sei noch angemerkt, daß es uns bei diesen Versuchen im wesentlichen um die Vergleichswerte ankam zwischen dem Verhalten der Einzelfaktoren ohne und mit Zusatz von IAG und Prednisolon. während die absoluten Werte nur mit einer gewissen Vorsicht beurteilt werden können, da in unseren Ansätzen das Blut verschieden stark und zum Teil erheblich verdünnt vorlag.

II. Vergleich der Grenzflächen Blut-Glas und Blut-Luft einerseits gegenüber der Grenzfläche Blut-Polyvinylchlorid (PVC).

Die thermische Stabilität der Proteine sollte in beiden Fällen gleich sein. Grobmechanische Einwirkungen, Schaumbildung, Ausbildung von Ober-

flächenfilmen etc. war in Glas in stärkerem Maße zu erwarten als in PVC. Auch mit Unterschieden durch Kontaktaktivierungen von Enzymen, Adsorptionen an Grenzflächen, Kettenreaktionen, die sich durch Entzug von Ca-Ionen nicht verhindern lassen, war zu rechnen.

In den Versuchen bestätigten sich die Angaben verschiedener Untersucher, daß sowohl die Erythrozyten als auch die Thrombozyten in Behältnissen mit nicht benetzbarer Oberfläche lagerungsfähiger sind als in den üblichen Glasgefäßen (REISSIGL, MC ILVANI).

Die Anzahl der Erythrozyten lag in den PVC-Konserven nach 112 Tagen um 3.500.000, das sind um 10 % über der Erythrozytenzahl in Glaskonserven. Dieser Unterschied wird sehr viel deutlicher, wenn man die Menge ausgetretenen Hämoglobins bestimmt. Während nach 112 Tagen in der PVC-Konserve nur 342,5 mg% Hb ausgetreten war, lag dieser Wert in der Glaskonserve fast 20mal höher, nämlich bei 6.850 mg%.

Die scheinbare Differenz zwischen dem zahlenmäßig nur geringen Unterschied der roten Blutkörperchen in PVC-Konserven und Glas einerseits und dem auffällig hohen Unterschied der extrazellulären Farbstoffkonzentration ist mit einem Austritt des Sauerstoffträgers aus den Zellen bei erhaltener Morphe zu erklären. Entsprechend fand sich auch bei der Zellzählung in den Proben der Glaskonserve ein bedeutend höherer Anteil optisch leerer Erythrozyten.

Die von uns gefundenen Erythrozytenzahlen lagen sowohl in Glas- als auch in PVC-Konserven weit über den Ergebnissen von DONHUE bzw. SCHEITLIN.

Den von vielen Untersuchern beschriebenen K-Anstieg und Na-Abfall im Plasma - verursacht durch die Veränderung der Erythrozyten - konnten wir in unseren Messungen ebenfalls feststellen.

Bei den weißen Blutzellen fanden wir bei beiden Konservierungsarten schon nach 3 Tagen 10 % Zellen, die nach ihrer Struktur nicht mehr in das normale Blutbild einzuordnen waren. Der Anteil dieser Zellen, deren Kerne z. T. pyknotisch oder verdichtet waren, stieg in 2 Wochen auf über 70 %. Dabei konnten wir die Ergebnisse von KEIBL, LÖHR, SCHMIEDER, LUTZEYER u. KNOLL bestätigen, daß besonders die Granulozyten durch die Konservierung leiden, während die Lymphozyten sich als lagerungsfähiger erwiesen. Allerdings fanden wir erst nach 8 Tagen einen Schwund der Segmentkernigen um 50 % ihrer Anfangszahl, während SCHMIEDER, LUTZEYER u. KNOLL diesen Wert schon nach 3 Tagen nachwiesen.

Die weißen Blutzellen scheinen somit durch die andere Oberfläche der PVC-Beutel weder in ihrer Zahl noch in ihrer Zusammensetzung in gleicher Weise günstig wie die Erythrozyten beeinflusst zu werden.

Die Thrombozytenzahlen lagen bei uns in beiden Konserven über denen von GROSS u. STAUFENBERG und MC ILVANI und unter denen von KLIBSCH und von SOULIER, LARRIEU u. WARTELE.

Die von Anfang an in der PVC-Konserve höhere Zahl von Plättchen, die bis zum Ende des Versuches gleichviel höher war, deutet auch hier auf eine Schonung dieser Elemente hin, die sich schon beim Einfüllen (Unterdruck, Schaumbildung, nicht benetzbare Oberfläche) ausgewirkt haben muß.

Von den Gerinnungsfaktoren war es vor allem der Hageman-Faktor, der ein sehr deutliches verschiedenes Verhalten in PVC-Beuteln und Glasflaschen zeigte. Da er den oberflächenaktivsten Faktor darstellt, ist dies durchaus verständlich. Interessant ist, daß er in der Kunststoffkonserve in zunehmendem Maße spontan in seiner aktiven Form zunahm, während sich seine Gesamtmenge deutlich verringerte. Es scheint, daß die inaktive Form die beständige ist, und daß er über seine aktive Form in unwirksame Endprodukte überführt wird. Es ist durchaus wahrscheinlich, daß dieser Abbaumechanismus in vivo ebenfalls stattfindet, und daß demgegenüber eine stetige Neubildung die notwendige Konzentration im Blut aufrechterhält, so daß das fließende Gerinnungsgleichgewicht aufrecht erhalten wird.

Die Thrombokinasen zeigten ähnlich den obigen Versuchen einen initialen Abfall mit allmählichem Wiederanstieg und schließlich einen Aktivitätsrückgang. Der höher liegende Anfangswert in der Glaskonserve ist wahrscheinlich durch eine stärkere Zellschädigung (s. die oben beschriebene Anfangszahl der Thrombozyten i. d. Glaskons.) beim Abfüllen in die Glasbehälter verursacht. Ob dieser Schaden durch die Oberflächenverschiedenheiten oder durch den Unterdruck in den üblichen Konserven verursacht wurde, kann hier nicht entschieden werden. Wahrscheinlich spielen beide Faktoren eine Rolle. Sonst war ihr Verhalten in beiden Konserven gleich.

Alle übrigen Gerinnungsfaktoren, sowie die Plasminogen- und die Thrombininhibitoraktivitäten zeigten kein über die Fehlerbreiten hinausgehendes, dauernd unterschiedliches Verhalten.

Allgemein ist über die Ergebnisse dieser Versuche noch festzustellen: Der von uns gemessene Schwund des Prothrombinkomplexes (Quick-Zeit) entspricht in etwa den Angaben neuerer Untersucher (HALBERSTADT,

KLIEBSCH, THIESS u. BOECKER). Auf Grund der neueren Kenntnisse über das Zusammenwirken im Prothrombinkomplex, der Ähnlichkeit der Kurven der Quick-Zeit und des Faktors V und da das Prothrombin und der Faktor VII weniger abfallen, können wir uns der Meinung der meisten Autoren, daß der Rückgang der Aktivität des Prothrombinkomplexes durch den Faktor V-Schwund bedingt sei, durchaus anschließen.

Den Abfall der Prothrombinaktivität fanden wir ähnlich den Untersuchungen von SOULIER u. Mitarb., KLIEBSCH und HALBERSTADT. Damit können wir die Angaben von KOLLER, der eine viel größere Stabilität des Faktors II angibt, nicht bestätigen.

Die Messungen des Proaccelerins zeigten bei uns auch den allgemein angegebenen starken Schwund dieses Faktors. Wir fanden jedoch nicht so starke Abnahmen wie HALBERSTADT, KLIEBSCH, SOULIER u. Mitarb. Vielmehr lagen unsere Ergebnisse in den ersten Wochen ähnlich denen von RAPAPORT, AMES u. MIKKELSEN und nach 3 Monaten ähnlich denen von THIESS u. BOECKER.

Die Thrombininhibitoraktivität verhält sich nach unseren Messungen ähnlich wie bei ALDEHOFF, BRUNNER u. WEIDENBACH. Die Angaben von KLIEBSCH und von REISSIGL konnten wir nicht bestätigen.

Das Plasminogen, über dessen Verhalten bei Lagerung noch keine Untersuchungen vorlagen, zeigte eine sehr gute Stabilität.

Daß die Ergebnisse der Zählung der corpuskulären Elemente des Blutes - auch der, des in Glasbehältern aufbewahrten - über denen der meisten Autoren liegen, führen wir auf die angewandte Methode zurück, bei der jede Blutprobe nur einmal direkt vor der Untersuchung mechanisch und thermisch (Aufschütteln und Erwärmen auf Zimmertemperatur) belastet wurde.

Die Versuche zeigten, daß die Stabilität der Eiweißkörper während der Lagerung doch recht groß ist, und daß die Dauer der Verwendbarkeit der Konserven vor allem durch die Veränderungen der zellulären Anteile bestimmt wird.

Abschließend können wir feststellen, daß die Konservierung von Blut in Kunststoffbeuteln besonders in Bezug auf die corpuskulären Elemente und den Hageman-Faktor der Aufbewahrung in Glasflaschen überlegen ist und daß im Hinblick auf das übrige hämostyptische und fibrinolytische System die Kunststoffkonserve den bisher üblichen Glaskonserven nicht unterlegen ist. Somit kommt die Aufbewahrung von Blut in Kunststoffbeuteln der Idealforderung am nächsten, daß "alle flüssigen und festen Bestandteile im Konservenblut erhalten sein und bei der Blutübertragung noch vorhanden sein soll" (REISSIGL).

Zusammenfassung

- I. Es wurde am Verhalten des Gerinnungssystems untersucht, ob bei Zusatz von Nukleosiden, Prednisolon oder beiden in Kombination unterschiedliche Beeinflussungen auf Konservenblut auftreten. Dabei zeigten sich nur in den Thrombokinasenkonzentrationen verschiedene Verhaltensweisen. Diese werden auf einen durch die Zusätze geringeren Zellzerfall und eine höhere Resistenz der Zellwände zurückgeführt. Die Schutzwirkungen treten besonders bei längerer Lagerungsdauer in Erscheinung.

Das übrige Gerinnungssystem bleibt unbeeinflusst.

- II. Anhand der Zahl der corpuskulären Elemente und des Verhaltens des Gerinnungssystems wurden die Einwirkungen der Grenzflächen Blut-Glas und Blut-Luft einerseits (herkömmliche Glaskonserven) und der Grenzfläche Blut-Polyvinylchlorid (Plastik-Blutbeutel) ^{x)} andererseits beobachtet.

Die Aufbewahrung in Polyvinylchlorid (PVC) - Beuteln erwies sich für die Erythrozyten und Thrombozyten als schonendere Methode. Die Zahl der weißen Blutzellen fiel bei beiden Verfahren qualitativ und quantitativ gleich schnell ab.

Im Gerinnungssystem zeigte der Faktor XII (Hageman-Faktor) eine deutlich verlängerte Haltbarkeit in nicht aktivierter Form gegenüber der Glaskonserve. Dies wird auf eine geringere Kontaktaktivierung an der PVC-Oberfläche zurückgeführt.

Das übrige Gerinnungssystem, sowie die Plasminogen- und Thrombininhibitorkonzentrationen verhielten sich bei beiden Verfahren gleichlaufend.

Aus diesen Versuchsergebnissen wird auf eine bessere Eignung der PVC-Beutel zur Blutkonservierung gegenüber der herkömmlichen Glaskonserve geschlossen.

x) Firma Biotest - Serum - Institut, Frankfurt/M.

L i t e r a t u r

- 1.) ACKERKNECHT, H. E.: Kurze Geschichte der Medizin. - F. Enke Verlag, Stuttgart 1959
- 2.) ALDEHOFF, P., BRENNER, W., WIEDENBACH, H.: Über die Stabilität des Gerinnungspotentials in der Blutkonserve. - Zbl. Chir. 78, 1460-1463 (1953)
- 3.) BALDINI, M., COSTEA, N., DAMESHEK, W.: The Viability of Stored Human Platelets. - Blood, Vol. 16, No. 6, 1669-1692 (1960)
- 4.) BLUM, K. -U.: Frischblut oder Konservenblut. - Med. Klin. 7, 267-269 (1962)
- 5.) BLUM, K. -U.: Stoffwechseländerungen bei Lagerung von Blut. - Bibl. Haematol. 12, 20-63 (1960)
- 6.) CRONKITE, E. P. u. JACKSON, D. P.: Die Verwendung von Plättchen-transfusionen bei hämorrhagischen Erkrankungen. - Verlag Gg. Thieme, Stuttgart
- 7.) DEUTSCH, E.: Blutgerinnungsfaktoren. - Franz Deuticke, Wien (1955)
- 8.) EGLI, H.: Zur Physiologie der Blutgerinnung. - Dtsch. Med. Wschr. 84, 2290 (1959)
- 9.) EGLI, H. u. BUSCHA, H.: Zur Differenzierung und Kalzium-Abhängigkeit von Kontaktwirkungen benetzbarer Oberflächen auf die Blutthrombokinase-Bildung. - Thromb. et Diath. haemorrhag. III, 604-614 (1959)
- 10.) FISCHER, FERBER, FRITZSCHE, WOSEGIEN, SPIELMANN: Erythrozytenstoffwechsel u. Blutkonservierung. - Bibl. Haematol. Vol. 12pp. 76-93, (1960)
- 11.) GROSS, R. u. STAUFENBERG, E.: Die Erhaltung der Thrombozyten mit ihren Funktionen in Blutkonserven u. deren Eignung als Thrombozytenersatz. - Klin. Wschr. 34, 142-147 (1956)
- 12.) HALBERSTADT, E.: Die unterschiedliche gerinnungsfördernde Wirkung v. Frischblut u. Konservenblut. - Inaugural-Dissert., Frankfurt/M. (1958)

- 13.) HARDISTY, R. M. u. MARGOLIS, J.: The Role of Hageman-Faktor in the initiation of Bloodcoagulation. - Brit. J. Haematol. 203-211, (1959)
- 14.) HEPPNER, F.: Die Blutbank. - Verlag Springer, Wien
- 15.) HOLEMANS, R. u. GROSS, R.: The Influenz of Blood Patelets on Fibrinolysis. - Thromb. et Diath. Haemorrhag. Vol. VI, No. 2/3, 196-214, (1961)
- 16.) JUNG, E. G.: A Rapid Quantitativ Essay of Faktor VIII (AHG) without the Use of Haemophilia A Plasma. - Thromb. Diath. Haemorrhag. IV 323-330, (1960)
- 17.) JUNG, E. G. u. DUCKERT, F.: Wirkung von Plasmin (Fibrinolysin) auf die Gerinnungsfaktoren.
- 18.) KEIBL: Zit. n. Blum, K. -U.
- 19.) KETTENBORG: Zit. n. RAPAPORT, AMES, MIKKELSEN.
- 20.) KINDLER, M.: Wann soll Frischblut, wann Konservenblut übertragen werden? - Dtsch. Med. Wschr. 81, 982, (1956)
- 21.) KLIEBSCH, N.: Die Veränderungen der Gerinnungsfaktoren in la-gernden Blutkonserven. - Inaug. Diss. Frankfurt/M (1961)
- 22.) LÖHR: Zit. n. BLUM, K. -U.
- 23.) MARBET, R.: Einfache Methoden zur Untersuchung von Fibrinolyseproblemen. - Rö. u. Lab. Praxis 3/4, (1958)
- 24.) MC ILVANIE: Zit. n. GROSS, R.
- 25.) Medizinische-Chemische Untersuchungsmethoden, herausgeg. v. E. Merck AG, Darmstadt, (1958) Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
- 26.) OSTEN, W.: Thrombozytenzählung unter Verwendung von Sequenstrennatrium und hypotoner Kokain-Lösung. - Rö. u. Lab. Praxis 7, 91-93, (1959)
- 27.) PENICK u. BRINKHOUSE: Zit. n. RAPAPORT, AMES, MIKKELSEN.
- 28.) RAPAPORT, S. I., AMES, S. B. u. MIKKELSEN, S.: The Levels of Antihaemophilie Globin and Proaccelerin in Fresh and Bank Blood. - Am. J. Clin. Path. 31, 297-304, (1959)

- 29.) REISSIGL, H. : Die Bluttransfusion. - W. Maudrich Verlag, Wien, (1961)
- 30.) REISSIGL, H. : Frischblut oder Konservenblut. - Med. Klin. 22, 973-978, (1961)
- 31.) RÓKA, L. : Der Umbau von Prothrombin in Thrombin durch Trypsin. - Hoppe-Seyler's Zeitschr. 323, 145-154, (1961)
- 32.) RÓKA, L. u. WALTHER, B. : Der Einfluß von Thrombokinas-Lipid auf die Umformung von Prothrombin in Thrombin. - Proc. of the 8th Congr. Europ. Soc. Haematol. Wien, (1961)
- 33.) SCHMID, J. : Methode zur Bestimmung von Thrombininhibitoraktivität.
- 34.) SCHMIDER, LUTZEYER, KNOLL : Zit. n. REISSIGL, H.
- 35.) SOULIER, J. P., WARTELE, O., MENACHE, D. : Hageman-Trait and PTA-Deficiency; the Role of Contact of Blood with Glass. -
- 36.) SOULIER, J. P., LARRIEU, M. J., WARTELE, O. : Modifications de Facteurs de Coagulation dans le Plasma et le Sang conservé. - Sem. Hop. 30, 3117-3129 (1954)
- 37.) STRUMIA, M. : Praktische Aspekte der Blutkonservierung für Transfusionszwecke, - Fortschr. Haematol. Bd. II v. Trocantins Verlag Gg. Thieme, Stuttgart
- 38.) THIESS, H. A. und BOECKER, D. : Bluttransfusion als Substitutions-therapie bei Faktor V - und Faktor VII - Mangel. - Münch. Med. Wschr. 97, 1717-1718, (1955)
- 39.) WALTHER, G. : Über die Gerinnungsaktivität hämolysierter Erythrozyten v. Gesunden, Blutspendern und Kranken, - Bibl. haematol. Vol. 12, 346-350
- 40.) WOLF, P. : Studies of Temperatur and pH-Stability of Human Anti-haemophilic Faktor in Plasma and in a Concentrate. - Brit-J. Haematol. 5, 169-176 (1959)
- 41.) WRIGHT, J. S. : Nomenklatur der Blutgerinnungsfaktoren. - Med. Welt, 1230 (1962)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. L. Róka
für die Überlassung des Themas, seine Hilfe und
Führung durch diese Arbeit, sowie für viele darüber
hinaus gehende Anregungen für mein Studium danken.

Ehrenwörtliche Erklärung.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät
Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem
Titel

Untersuchungen über chemische und physikalische Beeinflus-
sung von Konservenblut

im Institut für vegetative Physiologie unter Leitung von Herrn
Prof. Dr. med. L. Róka ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und
bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation
angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fa-
kultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch
die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt/Main 20. 2. 63

Eike Kipka

Lebenslauf

Am 14. Januar 1937 wurde ich, Eike Hagen Kipka, in Trier als Sohn des Otto Alois Kipka und seiner Frau Maria Luise Wiltrude, geb.

Wagner geboren.

1943 bis 1944 besuchte ich die Diesterweg-Volksschule in Darmstadt, 1944 bis 1947 die Volksschule in Bad König i.O. 1947 wurde ich Schüler des Realgymnasiums Michelstadt i.O., das ich 1950 verließ um bis 1957 in Darmstadt in die Lichtenbergschule, Gymnasium für Jungen, zu gehen.

Im Frühjahr 1957 bestand ich dort die Reifeprüfung und begann mein Medizinstudium an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt/M. Wintersemester 1958/59 und Sommersemester 1959 studierte ich an der Justus Liebig-Universität in Gießen, wo ich auch das Physikum bestand. Die übrigen Semester meines Studiums war ich wieder Student der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt/M. Zur Zeit befinde ich mich im medizinischen Staatsexamen.

Darmstadt, im September 1962

Meine akademischen Lehrer waren :

A) Vorklinisch

In Frankfurt ;

Czerny	Ortmann
Felix	Ried
Frick	Róka
Giersberg	Royen
Halbsguth	Starck
Jantz	Wezler
Kramp	Wieland

In Gießen :

Behrens
Rollhäuser
Thauer

B) Klinisch

In Frankfurt :

Altmann	Holtz	Sandritter
Amelung	Kahlau	Schmidt
Artelt	Krücke	Schwenzer
Bethke	Landes	Siede
Boenninghaus	Lapp	Starck
Brehm	Leonhardi	Strnad
Fischer	Lieb	Thiel
Frowein	Martin	Ungeheuer
Gänsslen	Mittermaier	Weber
Geißendörfer	Otto	Weisse
Graff	Radenbach	Westermann
Güntz	Rajewsky	Wiedemann
Heinz	v. Reckow	Wiethold
Heller	Róka	Wilhelm
Herzberg	Rotter	Zimmermann
Hoff	de Rudder	Zutt

